

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 8 月 28 日 (28.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/070940 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09,  
9/42, C12P 1/02, D21C 3/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02058

(22) 国際出願日: 2003 年 2 月 25 日 (25.02.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-48675 2002 年 2 月 25 日 (25.02.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 王子製紙  
株式会社 (OJI PAPER CO., LTD.) [JP/JP]; 〒104-0061  
東京都中央区銀座四丁目 7 番 5 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 塚本 晃

(TSUKAMOTO, Akira) [JP/JP]; 〒134-0088 東京都江  
戸川区西葛西7-28-1-304 Tokyo (JP). 仲亀 誠司 (NAK-  
AGAME, Seiji) [JP/JP]; 〒261-0001 千葉県千葉市美浜  
区幸町1-11-5-412 Chiba (JP). 甲 真理 (KABUTO, Mari)  
[JP/JP]; 〒261-0001 千葉県千葉市美浜区幸町  
1-11-5-516 Chiba (JP). 杉浦 純 (SUGIURA, Jun) [JP/JP];  
〒216-0033 神奈川県川崎市宮前区宮崎6-3-1-402  
Kanagawa (JP). 阪口 寿子 (SAKAGUCHI, Hisako)  
[JP/JP]; 〒261-0001 千葉県千葉市美浜区幸町  
1-11-5-515 Chiba (JP). 古城 敦 (FURUJYO, Atsushi)  
[JP/JP]; 〒513-0806 三重県鈴鹿市算所2丁目7-8-208  
Mie (JP).(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒  
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5  
森ビル 3F Tokyo (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,

/続葉有/

(54) Title: CELLULOSE DIGESTING ENZYME GENE AND UTILIZATION OF THE GENE

(54) 発明の名称: セルロース分解酵素遺伝子及び該遺伝子の利用

(57) Abstract: A method of treating woodchips which comprises: the step of preparing a DNA encoding an antisense RNA which is substantially complementary to the whole transcription product of a basidiomycete-origin cellulose digesting enzyme gene or a part thereof; the step of constructing a vector which contains (a) the above DNA, or (b) a recombinant DNA containing the above DNA and a DNA fragment having a promoter activity wherein the DNA is bonded to the DNA fragment in such a manner that the antisense RNA of the cellulose digesting enzyme is formed by the transcription of the DNA; the step of effecting transcription with the use of the vector and thus preparing host cells having a suppressed cellulose digesting enzyme activity; and inoculating the woodchips with the host cells having a suppressed cellulose digesting enzyme activity to thereby treat the woodchips.

(57) 要約:

担子菌由来のセルロース分解酵素遺伝子の転写産物の全部又はその一部に対し  
て実質的に相補的なアンチセンスRNAをコードするDNAを調製する工程と、(a) 前記DNA、又は (b) 前記DNAとプロモーター活性を有するDNA断  
片とを含み、該DNAが転写によりセルロース分解酵素遺伝子のアンチセンスR  
NAが生成するように該DNA断片に結合されている、組換えDNA、を含むベ  
クターを作製する工程と、該ベクターを用いた形質転換を行い、セルロース分解  
酵素活性抑制宿主細胞を調製する工程と、該セルロース分解酵素活性抑制宿主細  
胞を木材チップに接種して処理する工程とを含む、木材チップの処理方法。

WO 03/070940 A1



LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,  
ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI

特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## セルロース分解酵素遺伝子及び該遺伝子の利用

## 技術分野

本発明は、セルロース分解酵素をコードする遺伝子のアンチセンス遺伝子を利用した木材チップの処理方法に関する。

## 背景技術

紙パルプ工業で製造されているパルプは、その製造方法により機械パルプと化学パルプに分けられる。

機械パルプは機械的エネルギーを用いて木材繊維を物理的に摩砕して製造する。木材成分をほとんどそのまま含んでいるため、高い収率で製造することができ、薄く不透明度の高い紙を作ることができる。しかしながら、摩砕のために大きな電力を必要とすると共に、紙力強度が出にくいという欠点がある。

前記のような問題を解決し、かつパルプ収率を低下させない微生物のスクリーニングが広く行われている。例えば、ハンノキの一次解繊サーモメカニカルパルプ (TMP) を担子菌であるファネロケエテ・クリソスポリウム (*Phanerochaete chrysosporium*) によりグルコース存在下で処理した後、二次解繊を行った場合、25 から 30 % 解繊エネルギーが減少したという報告がある (Bar-Lev and T.K. Kirk, Tappi J., 65, 111, 1982)。また、ファネロケエテ・クリソスポリウムとディコミタス・スクアレンス (*Dichomitus squalens*) を用い、アスペン材を処理した際には、コントロールと比べて紙力強度が増加している (Myers., Tappi J., 105, 1988)。Akamathu らは、コリオラス・ヒルスタス (*Coriolus hirsutus*) を含む白色腐朽菌 10 株を用いポプラ材上に培養し、パルプ収率、解繊エネルギー、パルプ強度について調べている。その結果、コリオラス・ヒルスタスでは解繊エネルギーが減少し、結晶化度が増加するなど、用いた菌株の中ではチップの前処理菌として好ましいことが示されたが、同時に収率が約 7 % であった (Akamathu et al., Mokuzaigakkaishi, 30 (8) 697-702, 1984)。また、Nishibe らは、白色腐

朽菌 61 種、85 株から予備選抜した 10 種類の腐朽菌を使って、サワグルミ木片と針葉樹 2 次離解 TMP を微生物分解し、選択的に脱リグニンを行い、パルプ繊維の崩壊が少ないコプリナス・シネレウス (*Coprinus cinereus*)、ファネロケエテ・クリソスポリウムを選抜し、グルコースと尿素の存在下では紙力強度の低下が抑えられることを示した。しかし、パルプ収率の低下が、14 日間、30℃の処理でそれぞれ 6.3%、9.7%であった。コリオラス・ヒルスタスを用いた場合、収率減は 7.5%であった (Nishibe et al., Japan Tappi, 42 (2), 1988)。Kashino らは、白色腐朽菌 IZU-154 を自然界からスクリーニングし、ファネロケエテ・クリソスポリウムやトラメテス・ベルシカラ (*Trametes versicolor*) より選択的にリグニンを分解し、広葉樹を 7 日間処理した場合、解繊エネルギーが 1/2~2/3 減少することを確認した。また、パルプ強度は約 2 倍増加した。針葉樹を 10~14 日間処理した場合には解繊エネルギーが 1/3 減少し、強度増加も得られた。培地を加えた場合には 7 日間で同等の結果を得ることができた (Kashino et al., Tappi J., 76 (12), 167, 1993)。さらに、米国では最近、USDA Forest Products Laboratory のグループを中心に研究機関、紙パルプ産業数社から成るリグニンコンソーシアムを形成し、リグニン分解力が高く、セルロース分解力の低い菌株のスクリーニングを行い、セリポリオプシス・サブバーミスポラ (*Ceriporiopsis subvermispora*) を自然界から新たに単離した。この株を用いて機械パルプの動力削減を検討し、例えば、TMP の製造エネルギーの 40% 近くを削減でき、このときの収率の低下が 3~5% 程度であり、心配される紙の強度への悪影響はなく、むしろ強度が上がっていると報告している。USDA Forest Products Laboratory では既にパイロットプラントを建設し、単離したセリポリオプシス・サブバーミスポラの実証試験を行っているが、米国内の工場を想定し、工場のチップヤードで微生物処理を行うことを考えている (Scott et al., Tappi J., 81. 12. 153, 1998)。しかし、チップを保存しているパイル内部が高温となるため、高温で効果の得られる菌株が必要とされているが、この単離したセリポリオプシス・サブバーミスポラは 32℃までの温度でしか効果が得られず、実用面での使用には不適切である。

また、これまでスクリーニングで得られてきた微生物はリグニン分解の選択性が必ずしも高くなく、リグニンのみでなく、セルロースも分解されてしまうため、



パルプ収率や紙力低下を生じる。従って、リグニン分解の選択性を高めた微生物、すなわち、リグニン分解能力には優れるが、セルロース分解は抑制する微生物の取得・作製がさらに求められている。

リグニン分解の選択性を高めた変異体は Ander らにより作製されている。彼らは、UV 照射により スポロトリチュム・プルベルレンタム (*Sporotrichum pulverulentum*) に変異処理を行い、セルラーゼ活性が弱い株である Cel144 の菌株の開発している。野生株とこのセルラーゼ欠損株 Cel144 とを用いてカバ材木片の分解を行ったところ、前者がリグニン及びキシランをよく分解するのに対し、後者はリグニン及びキシランをよく分解するが、グルカンをほとんど分解しなかった (Ander and Eriksson, *Svensk Papperstidning*, 18, 643, 1975)。この Cel144 を用いてバーチ材を 6 週間処理した後、機械パルプの製造を行ったところ、紙力強度の増加が見られた (Ander and Eriksson, *Svensk Papperetidning*, 18, 641, 1975)。また、バーチ材とパイン材を用いて実験を行い、処理時間を増加させることによって、繊維のフィブリル化とリファイニングのエネルギーが 30% 減少したと報告している (Eriksson and Vallander., *Svensk Papperstid*, 85, R33, 1982)。彼らはフィレビア・ラヂアータ (*Phlebia radiata*) においても同様にセルラーゼ活性の弱い株 Cel26 を作製した。この Cel26 でパイン材のチップとパルプを処理した後、機械パルプを製造した際、いずれの場合も紙力の改善は見られなかったものの、解繊エネルギーの低下が見られた。また、重量減少は 2 % 以下であった (Samuelsson et al., *Svensk Papperstid*, 8, 221, 1980)。

上記のようにセルラーゼ活性の弱い変異株の作製が行われ、機械パルプ処理への利用の検討が行われているが、これらの変異株は紫外線照射により変異処理しているため、変異株の成長速度が遅く、分解処理に長時間かかってしまうという問題がある。このため、成長速度には影響せずセルロース分解活性のみを抑える変異株の作製が望まれている。

一方、化学パルプは、化学薬品を用いて木材中のリグニンを溶出させセルロース、ヘミセルロースを取り出す製造方法である。現在では水酸化ナトリウムと硫化ナトリウムを用いて脱リグニンを行うクラフトパルプが主流となっている。クラフトパルプにおいても機械パルプと同様に微生物処理を行い、蒸解前に脱リグ

ニンを行うことでの製造エネルギーの削減、パルプ品質の向上が試みられている。

例えばファネロケエテ・クリソスポリウムを用いて、レッドオーク材やアスペン材を 30 日間処理すると、同一 Ka 価における収率が向上し、叩解エネルギーが削減すること、また、引張り強度と破裂強度が増加するという報告がある (Oriaran et al., Tappi, 73, 147, 1990)。同じく、ファネロケエテ・クリソスポリウムを用いた実験において、破裂強度、引裂き強度の増加が報告されている (Chen et al., Wood Fiber Sci., 27, 198, 1995)。Molina らはラジアータパインをトラメタス・ベルシコラとフルオロータス・オストリータス (*Pleurotus ostreatus*) で処理した際には、11~14%の製造エネルギーが削減できると報告している。しかしながら、トラメタス・ベルシコラの場合にはパルプ強度の減少が見られる (Molina, 50th Appita Annual General Conference, pp.57-63, 1996; Molina, 51th Annual General Conference, pp. 199-206)。Bajpai らは、セリポリオプシス・サブバリスポラを用いた実験において活性アルカリを 18%削減し、蒸解時間を 33%削減し、白液中の硫化度を 30%削減することができることを報告している (P. Bajpai et al. J. Pulp and Paper Science: 27 (7), 235-239, 2001)。

上記のように、クラフトパルプにおける微生物処理は蒸解性を向上させエネルギーの削減をもたらすが、収率や紙力強度を低下させる場合があり、機械パルプと同様に微生物処理を実用化するには、リグニンを分解する能力には優れるが、セルロースを分解する能力は抑制されている、リグニン分解の選択性を高めた微生物の取得・作製が必要となっている。

そのセルロースを分解する酵素（セルロース分解酵素）の中で、セルラーゼと総称される酵素は $\beta$ -1, 4-グルカン（セルロース）又はその誘導体の $\beta$ -1, 4-グルコピラノシル結合を加水分解する酵素であり、高等植物、菌類、細菌などの微生物、軟体動物などに広く分布している。セルラーゼは、セルロース主鎖の $\beta$ -1, 4-グルコピラノシル結合をエンド型に加水分解する、いわゆるエンドグルカナーゼ（CMCアーゼ）と、セルロース主鎖のうち末端から主にセロビオース残基を切り取る、いわゆるエキソグルカナーゼ（アビセラーゼ）とに大別されることが知られている。そして、これらの加水分解酵素がセルロースに相乗的に作用することによりセルロース基質が低分子化してセロビオースを生じ、さ

らに $\beta$ -グルコシダーゼが関与することにより、グルコース単位まで分解される。

また、セロビオースデヒドロゲナーゼは、セロビオースやセロオリゴ糖を酸化してセロビオノラクトンを生成すると同時にキノン、鉄などの金属錯体、フェノキシラジカル、酸素などを還元する酸化還元酵素である。この酵素は、微生物がセルロースを分解するときにセルラーゼと同時に産生される(Eriksson et al., FEBS Lett., 49, 282-285, 1974)こと、セロビオースによるセルラーゼ活性の阻害、すなわち生成物阻害を解除する(Igarashi et al., Eur. J. Biochem., 253, 101, 1998)ことから、セルラーゼとの共役でセルロース分解を促進すると考えられている。また、セロビオースデヒドロゲナーゼは強力にセルロースを分解するハイドロキシラジカルを発生する Fenton 反応を引き起こすため、セルロース分解に深く関与していると考えられている。このことは Dumonceaux らによるセロビオースデヒドロゲナーゼ活性を抑制した変異株の作製ならびにその諸性質の検討結果によっても示唆されている。彼らは、抗生物質であるフェロマイシンを指標にした相同組換え法によるセロビオースデヒドロゲナーゼ欠損株の作製を行い、セロビオースデヒドロゲナーゼ欠損株では非晶性セルロースを炭素源とした場合には野生株と成長速度が変わらないが、結晶性セルロース上で培養した際には生育速度が著しく遅くなること、セロビオースデヒドロゲナーゼ欠損株においても広葉樹未漂白パルプのリグニンや合成リグニンである $^{14}\text{C}$ -DHP を野生株と同等に分解することを報告している(Dumonceaux, Enzyme and Microb. 29, 478-489, 2001)。

セロビオースデヒドロゲナーゼの総説 (G. Henriksson et al., J. Biotechnol. 78 (2000) 93-113) 等によれば、セロビオースデヒドロゲナーゼを生産する微生物としてはファネロケエテ・クリソスポリウム (*Phanerochaete chrysosporium*)、トラメテス・ベルシコラ (*Trametes versicolor*)、スキゾフィラム・コミュネ (*Schizophyllum commune*)、コネオフォラ・プテアナ (*Coneophora puteana*)、ミセリオプトレ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*)、フミコーラ・インソレンス (*Fusicola insolens*) 等の木材腐朽菌が挙げられている。

また、セロビオースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 (以下、セロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子と称する) については、例えば、ファネロケエテ・クリソスポリウムでは、K3 株の cDNA (Raices et al., FEBS Letters, 69, 233-238,

1995)、OGC101 株では cDNA (Li et al., Appl. Environ. Microbiol., 62(4), 1329-1335, 1996)、染色体遺伝子のクローニングが行われている (Li et al. Appl. Environ. Microbiol., 63(2), 796-799, 1997)。また、トラメテス・ベルシカラ (T. J. Dumonceaux et al., Gene. 210, 211-219 (1998)) や、ピクノポラス・シンナバリナス (S. M. Moukha et al., Gene, 234, 23-33, 1999) においてもセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子が報告されている。

しかしながら、上記のようにセロビオースデヒドロゲナーゼやそれをコードする遺伝子の開示はあるが、機械パルプや化学パルプ製造における微生物処理にあたって、リグニン分解の選択性を高めた微生物の取得・作製に必要なコリオラス・ヒルスタス由来のセロビオースデヒドロゲナーゼをはじめとするセルロース分解酵素やセルロース分解酵素遺伝子の解明、並びに該遺伝子を用いた遺伝子組換え技術は報告されていない。また、そのような技術によって得られる形質転換体を用いての効果的なパルプ処理方法についても開示はされていない。

一方、セルロース分解酵素の利用に対しても、以前から強い関心が持たれている。例えば、家庭用洗剤への添加、繊維などのセルロース系高分子材料の表面処理による改質、古紙からの脱インク処理、食品の加工処理など、極めて多方面での利用が検討されてきている。このため、セルロース分解酵素を高生産する方法が求められており、セロビオースデヒドロゲナーゼの高生産に関する試みとしては、ファネロケエテ・クリソスポリウムのセロビオースデヒドロゲナーゼ 1 遺伝子の上流に構成的に働くプロモーターである D-グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼを連結させた報告がある (Li., Biochem. Biophys. Res. Commun., 270, 141-146, 2000)。しかしながら、ファネロケエテ・クリソスポリウムは日本では有害菌に指定されているため利用することはできない。従って、有害でない微生物を用いたセロビオースデヒドロゲナーゼをはじめとするセルロース分解酵素を高生産し得る技術の開発が求められているが、これまで、コリオラス・ヒルスタス由来のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子等のセルロース分解酵素遺伝子を用いたそのような技術の報告はなされていない。

## 発明の開示

本発明は、セルロース分解酵素をコードする遺伝子のアンチセンス遺伝子を利用した木材チップの処理方法を提供することを目的とする。

本発明者らは上記課題を解決するために、セロビオースデヒドロゲナーゼ等をはじめとするセルロース分解酵素生産菌を求め、広範なスクリーニングを行い鋭意研究を行った結果、コリオラス・ヒルスタスがセルロース分解酵素を生産することを見い出した。更に、それらのセルロース分解酵素をコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。また、該遺伝子のアンチセンス遺伝子を利用した該遺伝子の発現を制御する方法を開発し、該方法を用いて木材チップでパルプを製造した際、収率や紙力強度低下を抑制することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下を提供する。

(1) 担子菌由来のセルロース分解酵素遺伝子の転写産物の全部又はその一部に対して実質的に相補的なアンチセンスRNAをコードするDNAを調製する工程と、

(a) 前記DNA、又は

(b) 前記DNAとプロモーター活性を有するDNA断片とを含み、該DNAが、転写によりセルロース分解酵素遺伝子のアンチセンスRNAが生成するように該DNA断片に結合されている、組換えDNA、を含むベクターを作製する工程と、

該ベクターを用いた形質転換を行い、セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞を調製する工程と、

該セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞を木材チップに接種して処理する工程とを含む、木材チップの処理方法。

(2) セルロース分解酵素遺伝子が、セロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子、セロビオヒドロラーゼI、セロビオヒドロラーゼII、糖分解酵素ファミリー61に属するエンドグルカナーゼ遺伝子、糖分解酵素ファミリー12に属するエンドグルカナーゼ遺伝子、糖分解酵素ファミリー5に属するエンドグルカナーゼ遺伝子、及び糖分解酵素ファミリー9に属するエンドグルカナーゼ遺伝子からなる群から選択される1種以上である、(1)に記載の方法。

(3) セロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子が、以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む単離されたセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子である、(2) に記載の方法。

(a) 配列番号 1 又は 3 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセロビオースデヒドロゲナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 1 又は 3 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつセロビオースデヒドロゲナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(4) セロビオヒドロラーゼ I 遺伝子が、以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む単離されたセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子である、(2) に記載の方法。

(a) 配列番号 7、9 又は 11 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 7、9 又は 11 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(5) セロビオヒドロラーゼ II 遺伝子が、以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む単離されたセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子である、(2) に記載の方法。

(a) 配列番号 14 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 14 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子酵素活性を有す

るタンパク質をコードする塩基配列。

(6) 糖分解酵素ファミリー61に属するエンドグルカナーゼ遺伝子が、以下の(a)～(c)のいずれかの塩基配列を含む単離された糖分解酵素ファミリー61に属するエンドグルカナーゼ遺伝子である、(2)に記載の方法。

(a) 配列番号18で表される塩基配列。

(b) (a)の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ糖分解酵素ファミリー61に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号18において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ糖分解酵素ファミリー61に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(7) 糖分解酵素ファミリー12に属するエンドグルカナーゼ遺伝子が、以下の(a)～(c)のいずれかの塩基配列を含む単離された糖分解酵素ファミリー12に属するエンドグルカナーゼ遺伝子である、(2)に記載の方法。

(a) 配列番号20で表される塩基配列。

(b) (a)の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ糖素分解酵素ファミリー12に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号20において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ糖分解酵素ファミリー12に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(8) 糖分解酵素ファミリー5に属するエンドグルカナーゼ遺伝子が、以下の(a)～(c)のいずれかの塩基配列を含む単離された糖分解酵素ファミリー5に属するエンドグルカナーゼ遺伝子である、(2)に記載の方法。

(a) 配列番号24で表される塩基配列。

(b) (a)の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ糖分解酵素ファミリー5に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号24において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付

加された塩基配列からなり、かつ糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(9) 糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子が、以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む単離された糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子である、(2) に記載の方法。

(a) 配列番号 28 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 28 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(10) 担子菌が、コリオラス・ヒルスタス (*Coriolus hirsutus*) 又はファネロケエテ・クリソスポリウム (*Phanerochaete chrysosporium*) である、(1) ~ (9) のいずれかに記載の方法。

(11) 宿主細胞がコリオラス・ヒルスタスである、(1) ~ (10) のいずれかに記載の方法。

(12) (1) ~ (11) のいずれかに記載の方法によって得られる木材チップ。

(13) (12) に記載の木材チップを用いたパルプの製造法。

(14) (13) に記載の方法によって得られるパルプ。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2002-48675 号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、セロビオースに本発明のセロビオースデヒドロゲナーゼを作用させたときの反応の分析結果を示す図である。

図 2 は、本発明のセロビオースデヒドロゲナーゼの至適 pH を示す図である。



図中、◆はグリシン-HClを示し、■は酢酸を示し、▲はリン酸を示す。

図3は、本発明のセロビオースデヒドロゲナーゼのpH安定性を示す図である。

図中、◆はグリシン-HClを示し、■は酢酸を示し、▲はリン酸を示す。

図4は、本発明のセロビオースデヒドロゲナーゼの反応至適温度を示す図である。

図5は、本発明のセロビオースデヒドロゲナーゼの熱安定性を示す図である。

#### 配列表の説明

配列番号5はブランクハイブリダイゼーション用プローブである。

配列番号6はブランクハイブリダイゼーション用プローブである。

配列番号13はブランクハイブリダイゼーションに用いたプローブである。

配列番号16はPCR反応用プライマーである。

配列番号17はPCR反応用プライマーである。

配列番号22はPCR反応用プライマーである。

配列番号23はPCR反応用プライマーである。

配列番号26はPCR反応用プライマーである。

配列番号27はPCR反応用プライマーである。

配列番号30はPCR反応用プライマーである。

配列番号31はPCR反応用プライマーである。

配列番号32はPCR反応用プライマーである。

配列番号33はPCR反応用プライマーである。

配列番号34はPCR反応用プライマーである。

配列番号35はPCR反応用プライマーである。

配列番号36はPCR反応用プライマーである。

配列番号37はPCR反応用プライマーである。

配列番号38はPCR反応用プライマーである。

配列番号39はPCR反応用プライマーである。

配列番号40はPCR反応用プライマーである。

配列番号41はPCR反応用プライマーである。

配列番号 4 2 は P C R 反応用プライマーである。

配列番号 4 3 は P C R 反応用プライマーである。

配列番号 4 4 は P C R 反応用プライマーである。

配列番号 4 5 は P C R 反応用プライマーである。

配列番号 4 6 は P C R 反応用プライマーである。

配列番号 4 7 は P C R 反応用プライマーである。

配列番号 4 8 は P C R 反応用プライマーである。

配列番号 4 9 は P C R 反応用プライマーである。

配列番号 5 0 は P C R 反応用プライマーである。

配列番号 5 1 は P C R 反応用プライマーである。

配列番号 5 2 は P C R 反応用プライマーである。

#### 発明を実施するための形態

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明は、担子菌由来のセルロース分解酵素遺伝子の転写産物の全部又はその一部に対して実質的に相補的なアンチセンスRNAをコードするDNAを調製する工程と、(a) 前記DNA、又は(b) 前記DNAとプロモーター活性を有するDNA断片とを含み、該DNAが、転写によりセルロース分解酵素遺伝子のアンチセンスRNAが生成するように該DNA断片に結合されている、組換えDNA、を含むベクターを作製する工程と、該ベクターを用いた形質転換を行い、セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞を調製する工程と、該セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞を木材チップに接種して処理する工程とを含む、木材チップの処理方法、を提供する。

本明細書において、担子菌とは、セルロース分解能を有する属種であればいかなる菌も利用可能であるが、特に、和名をアラゲカワラタケと称するコリオラス・ヒルスタス (*Coriolus hirsutus*) が好適である。

また、セルロース分解酵素遺伝子とは、セルロースを分解し得る酵素であれば特に限定されないが、例えば、セロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子、セロビオ

ヒドロラーゼ I 遺伝子、セロビオヒドロラーゼ II 遺伝子、及びエンドグルカナーゼ遺伝子が好ましい。具体的には、以下の 1. ～ 7. に示すような各種遺伝子を使用することができる。なお、これらの遺伝子は単独で使用することもできるが、1 種以上を組み合わせて使用してもよい。

1. 以下の (a) ～ (c) のいずれかの塩基配列を含む、単離されたセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子。

(a) 配列番号 1 又は 3 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセロビオースデヒドロゲナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 1 又は 3 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつセロビオースデヒドロゲナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

2. 以下の (a) ～ (c) のいずれかの塩基配列を含む、単離されたセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子。

(a) 配列番号 7、9 又は 11 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 7、9 又は 11 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

3. 以下の (a) ～ (c) のいずれかの塩基配列を含む、単離されたセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子。

(a) 配列番号 14 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 14 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加

された塩基配列からなり、かつセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

4. 以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む、単離された糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子。

(a) 配列番号 18 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ酵素分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 18 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ酵素分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

5. 以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む、単離された糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子。

(a) 配列番号 20 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ酵素分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 20 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ酵素分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

6. 以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む、単離された糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子。

(a) 配列番号 24 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ酵素分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 24 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ酵素分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

7. 以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む、単離された糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子。

(a) 配列番号 28 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ酵素分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 28 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ酵素分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

上記 1. に記載のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子は以下のような手順で得ることができる。

コリオラス・ヒルスタスから、Yelton らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1470 (1984)) 等の通常の染色体 DNA の抽出法を用いて染色体 DNA を調製する。次に、得られた染色体 DNA を Sau3AI 等の適当な制限酵素で処理し、部分分解を行った後ショ糖密度勾配超遠心法で分画して 10kbp~25kbp の DNA 断片を得る。同じ付着末端を生じさせる制限酵素で処理したファージ DNA に、上記で得られた DNA 断片を連結する。ファージ DNA としては、例えば、EMBL3 (A-M, Frishauf et al., J. Mol. Biol. 170, 827 (1983)) のファージ DNA が用いられる。得られた DNA 断片連結ファージについて *in vitro* でパッケージングを行い、染色体 DNA ライブラリーとする。また、サブクローニングには、常用のクローニングベクター、好ましくは大腸菌ベクター、例えば、pUC 系である pUC18 (C. Yanisch-Perron, et al., Gene, 33, 103 (1985)) 等のプラスミドを用いることができる。クローニングベクターは、上記例示のものに制限されず、市販されるか、文献記載の公知のものが使用できる。

上記で得られた染色体遺伝子ライブラリーからのセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子の単離にあたっては、精製後のコリオラス・ヒルスタスのセロビオースデヒドロゲナーゼをリジルエンドペプチダーゼを用いて完全消化し、アミノ酸シーケンスを行い、このアミノ酸配列から推定されるヌクレオチド配列に基づいて作製した合成 DNA プローブを用い、ブランクハイブリダイゼーションにより

セロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むクローンを選択する。選択したクローンからセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片を単離し、制限酵素地図の作成および配列決定を行う。配列決定は、上記のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む断片を適当なクローニングベクター（例えば pUC19 等の pUC 系ベクター）に挿入し、Sanger らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)) によって行うことができる。

上記の手順により、コリオラス・ヒルスタス由来のセロビオースデヒドロゲナーゼをコードする配列番号 1 及び 3 で表される塩基配列が決定された。3420 bp の塩基配列からなる配列番号 1 及び 3480 bp の塩基配列からなる配列番号 3 を有する遺伝子は、それぞれコリオラス・ヒルスタス由来のセロビオースデヒドロゲナーゼ 1 遺伝子とセロビオースデヒドロゲナーゼ 2 遺伝子と命名した 7207 bp と 5345 bp からなるセロビオースデヒドロゲナーゼゲノム遺伝子の構造遺伝子である。

配列番号 1 で表されるセロビオースデヒドロゲナーゼ 1 遺伝子の構造遺伝子部分は、16 個のエキソンと 15 個のイントロンに（介在配列）によって構成されている。

具体的には、エキソン 1 は 129～177、イントロン 1 は 178～239、エキソン 2 は 240～498、イントロン 2 は 499～557、エキソン 3 は 558～667、イントロン 3 は 668～716、エキソン 4 は 717～833、イントロン 4 は 834～885、エキソン 5 は 886～1028、イントロン 5 は 1029～1077、エキソン 6 は 1078～1242、イントロン 6 は 1243～1301、エキソン 7 は 1302～1374、イントロン 7 は 1375～1425、エキソン 8 は 1426～1480、イントロン 8 は 1481～1534、エキソン 9 は 1535～2165、イントロン 9 は 2166～2223、エキソン 10 は 2224～2351、イントロン 10 は 2352～2407、エキソン 11 は 2408～2456、イントロン 11 は 2457～2509、エキソン 12 は 2510～2598、イントロン 12 は 2599～2653、エキソン 13 は 2654～2799、イントロン 13 は 2800～2859、エキソン 14 は 2860～2930、イントロン 14 は 2931～2995、エキソン 15

は2996～3100、イントロン15は3101～3157、エキソン16は3158～3274にそれぞれ存在している。さらにヌクレオチド番号3275～はターミネーターを含む3'非翻訳領域である。

さらに、塩基配列の解析から推定されるアミノ酸配列は、768アミノ酸残基からなる配列番号2で表されるアミノ酸配列であることがわかった。

また、配列番号3で表されるセロビオースデヒドロゲナーゼ2遺伝子の構造遺伝子部分は、16個のエキソンと15個のイントロンによって構成されている。

具体的には、エキソン1は159～207、イントロン1は208～269、エキソン2は270～528、イントロン2は529～587、エキソン3は588～697、イントロン3は698～746、エキソン4は747～863、イントロン4は864～915、エキソン5は916～1058、イントロン5は1059～1107、エキソン6は1108～1272、イントロン6は1273～1331、エキソン7は1332～1404、イントロン7は1405～1455、エキソン8は1456～1510、イントロン8は1511～1564、エキソン9は1565～2195、イントロン9は2196～2253、エキソン10は2254～2381、イントロン10は2382～2437、エキソン11は2438～2486、イントロン11は2487～2539、エキソン12は2540～2628、イントロン12は2629～2683、エキソン13は2684～2829、イントロン13は2830～2887、エキソン14は2888～2958、イントロン15は2959～3025、エキソン15は3026～3130、イントロン15は3131～3208、エキソン16は3209～3325、ヌクレオチド番号3326～はターミネーターを含む3'非翻訳領域である。

さらに、塩基配列の解析から推定されるアミノ酸配列は、768アミノ酸残基からなる配列番号4で表されるアミノ酸配列であることがわかった。

また、セロビオースデヒドロゲナーゼ1遺伝子では、配列番号1で表される塩基配列のうちの第129番目～第3274番目の塩基を含んでなるセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子が有用であり、セロビオースデヒドロゲナーゼ2遺伝子では、配列番号3で表される塩基配列のうちの第159番目～第3325番目の

塩基を含んでなるセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子が特に有用である。

コリオラス・ヒルスタス由来のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子のDNA断片は、上記セロビオースデヒドロゲナーゼ染色体遺伝子を含むDNA断片からPCRによって得ることができる。PCRのプライマーとしては、配列番号1、3で表される塩基配列及びその相補的配列に基づく、約10～50塩基、好ましくは約15～30塩基からなる配列をセンスプライマー、アンチセンスプライマーとして用いることができる。例えば、配列番号31で表されるセンスプライマー、配列番号32で表されるアンチセンスプライマーを使用することができる(実施例12参照)。

なお、コリオラス・ヒルスタス由来のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子配列を含むゲノムDNAを保有する大腸菌形質転換株、*Escherichia coli* JM109/pCHCDH1 及び *Escherichia coli* JM109/pCHCDH2 は、2002年2月8日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に寄託され、それぞれ受託番号FERM BP-8278、FERM B-8279 が付与されている。これらの寄託株に含まれる配列番号1又は3で表される塩基配列を有するDNAも、本発明に包含される。

また、上記2. に記載のセロビオヒドロラーゼI遺伝子は以下のような手順で得ることができる。

上記1. に記載の遺伝子の調製と同様の手順でブランクハリブリダイゼーションを行い、セロビオヒドロラーゼI遺伝子を含むクローンを調製する。選択したクローンからセロビオヒドロラーゼI遺伝子を含むDNA断片を単離し、制限酵素地図の作成および配列決定を行う。配列決定は、セロビオヒドロラーゼI遺伝子を含むDNA断片を適当なクローニングベクター（例えばpUC19等のpUC系ベクター）に挿入し、Sangerらの方法(前述)によって行うことができる。

上記の手順により、コリオラス・ヒルスタス由来のセロビオヒドロラーゼIをコードする配列番号7、9、11で表される塩基配列が決定され、各々をセロビオヒドロラーゼI-1遺伝子とセロビオヒドロラーゼI-2遺伝子、セロビオヒドロラーゼI-3遺伝子と命名した。

さらに、各々の塩基配列の解析から推定されるアミノ酸配列は、456アミノ



酸残基からなる配列番号 8 で表されるアミノ酸配列、456 アミノ酸残基からなる配列番号 10 で表されるアミノ酸配列、また、457 アミノ酸残基からなる配列番号 12 で表されるアミノ酸配列であることがわかった。

上記のセロビオヒドロラーゼ I-1 ~ 3 遺伝子の DNA 断片は、上記セロビオヒドロラーゼ I-1 ~ 3 の各染色体遺伝子を含む DNA 断片から PCR によって得ることができる。PCR のプライマーとしては、各遺伝子の前記塩基配列（配列番号 7、9、11）及びその相補的配列に基づく、約 10 ~ 50 塩基、好ましくは約 15 ~ 30 塩基からなる配列をセンスプライマー、アンチセンスプライマーとして用いることができる。

また、上記 3. に記載のセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子は以下のような手順で得ることができる。

上記 1. に記載の遺伝子の調製と同様の手順でブラークハリブリダイゼーションを行い、セロビオヒドロラーゼ II 遺伝子を含むクローンを調製する。選択したクローンからセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子を含む DNA 断片を単離し、制限酵素地図の作成および配列決定を行う。配列決定は、セロビオヒドロラーゼ II 遺伝子を含む DNA 断片を適当なクローニングベクター（例えば pUC19 等の pUC 系ベクター）に挿入し、Sanger らの方法（前述）によって行うことができる。

上記の手順により、コリオラス・ヒルスタス由来のセロビオヒドロラーゼ II をコードする配列番号 14 で表される塩基配列が決定された。さらに、塩基配列の解析から推定されるアミノ酸配列は、453 アミノ酸残基からなる配列番号 15 で表されるアミノ酸配列であることがわかった。

セロビオヒドロラーゼ II 遺伝子の DNA 断片は、セロビオヒドロラーゼ I II 染色体遺伝子を含む DNA 断片から PCR によって得ることができる。PCR のプライマーとしては、前記塩基配列及びその相補的配列に基づく、約 10 ~ 50 塩基、好ましくは約 15 ~ 30 塩基からなる配列をセンスプライマー、アンチセンスプライマーとして用いることができる。

また、上記 4. に記載の糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子は以下のような手順で得ることができる。

コリオラス・ヒルスタスを木材チップ上で生育させた菌体から mRNA を回収

し、通常の方法に準じて cDNA ライブラリーを作製する。得られた cDNA ライブラリーからの糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子の単離にあたっては適切な寒天培地上でプラークを形成させ、無作為にプラークを単離し、適切な 2 種類のプライマーによりコリオラス・ヒルスタス由来の cDNA 部分を増幅させ、塩基配列を解析することにより糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子を含む DNA 断片を単離することができる。

上記の手順により、コリオラス・ヒルスタス由来の糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼをコードする配列番号 18 で表される塩基配列が決定された。さらに、塩基配列の解析から推定されるアミノ酸配列は、374 アミノ酸残基からなる配列番号 19 で表されるアミノ酸配列であることがわかった。

糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子の DNA 断片は、上記糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子を含む DNA 断片から PCR によって得ることができる。PCR のプライマーとしては、配列番号 18 で表される塩基配列及びその相補的配列に基づく、約 10～50 塩基、好ましくは約 15～30 塩基からなる配列をセンスプライマー、アンチセンスプライマーとして用いることができる。

また、上記 5. に記載の糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子は以下のような手順で得ることができる。

上記 4. に記載の遺伝子の調製と同様の手順で無作為に cDNA ライブラリーからプラークを単離し、コリオラス・ヒルスタス由来の cDNA 部分を増幅後、塩基配列を解析することにより糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子を単離することができる。

上記の手順により、コリオラス・ヒルスタス由来の糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼをコードする配列番号 20 で表される塩基配列が決定された。さらに、塩基配列の解析から推定されるアミノ酸配列は、少なくとも 215 アミノ酸残基からなる配列番号 21 で表されるアミノ酸配列であることがわかった。

コリオラス・ヒルスタス由来の糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子の DNA 断片は、上記糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンド

グルカナーゼ遺伝子を含むDNA断片からPCRによって得ることができる。PCRのプライマーとしては、配列番号20で表される塩基配列及びその相補的配列に基づく、約10～50塩基、好ましくは約15～30塩基からなる配列をセンスプライマー、アンチセンスプライマーとして用いることができる。

また、上記6.に記載の糖分解酵素ファミリー5に属するエンドグルカナーゼ遺伝子は以下のような手順で得ることができる。

担子菌ファネロケエテ・クリソスポリウムを適切な培地で培養し、上記1.に記載のYeltonらの方法により染色体DNAを回収する。得られた染色体DNAに対し、ファネロケエテ・クリソスポリウムの染色体DNAデータ・ベースから予想される適切な2つのPCR用プライマーを作製し、常法により目的DNA断片を増幅し、糖分解酵素ファミリー5に属するエンドグルカナーゼ遺伝子を得ることができる。

上記の手順により、ファネロケエテ・クリソスポリウム由来の糖分解酵素ファミリー5に属するエンドグルカナーゼをコードする配列番号24で表される塩基配列が決定された。さらに、塩基配列の解析から推定されるアミノ酸配列は、386アミノ酸残基からなる配列番号25で表されるアミノ酸配列であることがわかった。

ファネロケエテ・クリソスポリウム由来の分解酵素ファミリー5に属するエンドグルカナーゼ遺伝子のDNA断片は、上記糖分解酵素ファミリー5に属するエンドグルカナーゼ遺伝子を含むDNA断片からPCRによって得ることができる。PCRのプライマーとしては、配列番号24で表される塩基配列及びその相補的配列に基づく、約10～50塩基、好ましくは約15～30塩基からなる配列をセンスプライマー、アンチセンスプライマーとして用いることができる。

また、上記7.に記載の糖分解酵素ファミリー9に属するエンドグルカナーゼ遺伝子は以下のような手順で得ることができる。

上記6.に記載の遺伝子の調製と同様の手順で適切なPCRプライマーにより糖分解酵素ファミリー9に属するエンドグルカナーゼ遺伝子を含むクローンを調製する。選択したクローンから糖分解酵素ファミリー9に属するエンドグルカナーゼ遺伝子を含むDNA断片を単離し、制限酵素地図の作成および配列決定を行

う。配列決定は、糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子を含む DNA 断片を適当なクローニングベクター（例えば pUC19 等の pUC 系ベクター）に挿入し、Sanger らの方法（前述）によって行うことができる。

上記の手順により、ファネロケエテ・クリソスポリウム由来の糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼをコードする配列番号 28 で表される塩基配列が決定された。さらに、塩基配列の解析から推定されるアミノ酸配列は、592 アミノ酸残基からなる配列番号 29 で表されるアミノ酸配列であることがわかった。

糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子の DNA 断片は、上記糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子を含む DNA 断片から PCR によって得ることができる。PCR のプライマーとしては、配列番号 28 で表される塩基配列及びその相補的配列に基づく、約 10 ～ 50 塩基、好ましくは約 15 ～ 30 塩基からなる配列をセンスプライマー、アンチセンスプライマーとして用いることができる。

本方法の第 1 の工程においては、上記の担子菌由来のセルロース分解酵素遺伝子の転写産物の全部又はその一部に対して実質的に相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA を調製する。

本明細書において「アンチセンス RNA」とは、上記セルロース分解酵素遺伝子の転写産物である mRNA の全部又はその一部に対して実質的に相補的な配列を含んでなる塩基配列であって、細胞内に存在した場合に、相補的となるセルロース分解酵素遺伝子の mRNA と結合し、それによってセルロース分解酵素遺伝子の翻訳を阻害し、発現を抑制する配列を意味する。

また、「実質的に」とは、このアンチセンス RNA が mRNA と結合して二本鎖を形成し、それが mRNA のタンパク質への翻訳を阻害する限り、この配列に欠失、置換又は付加等の変化があってもよいことを意味する。

該配列の長さは、本発明のいずれかのセルロース分解酵素遺伝子の発現を抑制し得る長さであれば適宜設定可能であり、セルロース分解酵素遺伝子の塩基配列の全部と等しい長さである必要は必ずしもなく、該配列の一部に該当する長さであってよい。例えば、セルロース分解酵素遺伝子の発現を抑制する場合、配列番

号2及び4のヘム結合部位である80番目、128番目のアミノ酸、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)結合部位である236から241番目のアミノ酸をコードする塩基配列が含まれることが好ましい。

アンチセンスRNAの調製及び該配列を利用する方法については、当業者に公知の常法によって実施することができる。具体的には、セルロース分解酵素遺伝子のアンチセンスRNAは、セルロース分解酵素遺伝子の塩基配列のエキソン部分が得られるようにPCR法を行ったり、セルロース分解酵素遺伝子を適当な制限酵素で切断して得ることができる。また、セルロース分解酵素遺伝子のcDNAからも取得可能である。さらには、このアンチセンスRNAは、セルロース分解酵素遺伝子の塩基配列情報をもとに人工的に作られた合成RNAであっても良い。

本方法の第2の工程においては、(a)前記のようにして得られたアンチセンスRNAをコードするDNA、または(b)前記のようにして得られたアンチセンスRNAをコードするDNAと、プロモーター活性を有するDNA断片とを含み、該DNAが、転写によりセルロース分解酵素遺伝子のアンチセンスRNAが生成するように該DNA断片に結合されている、組換えDNA、を含むベクターを製作する。

本明細書において、「転写によりセルロース分解酵素遺伝子のアンチセンスRNAが生成するように」とは、宿主内でプロモーターの作用下でアンチセンスRNAをコードするDNAのmRNAへの転写が生じた際に、本発明のセルロース分解酵素遺伝子からのmRNAに対して結合して二本鎖を形成し、該セルロース分解酵素遺伝子の発現を抑制させることができるアンチセンスRNAが生成されることを意味する。

アンチセンスRNAが生成され得るように結合するには、プロモーター配列を有するDNA断片の下流にアンチセンスの方向(逆向き方向)にアンチセンスRNAをコードするDNAを結合し、プロモーターの作動によりmRNAに転写させればよい。得られるmRNAは、セルロース分解酵素遺伝子の塩基配列のアンチセンスRNAである。

プロモーター遺伝子としては、プロモーターの作用を有する遺伝子断片であれ

ば特に限定されることなく、あらゆる遺伝子を使用することができる。例えばGPDプロモーター、ras遺伝子プロモーターなどが挙げられる。これらのプロモーター遺伝子は、ジーンバンクに登録される配列、文献記載の配列等に基づいて周知のゲノムクローニングまたはPCR法によっても取得可能である。あるいは、寄託されている遺伝子については、分譲請求により入手可能なものを利用することができる。

プロモーター配列を含む遺伝子とセルロース分解酵素遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスRNAをコードするDNAは、必要に応じて制限部位の導入、平滑末端化または付着末端化後、適当なDNAリガーゼを用いて連結することができる。クローニング、連結反応、PCR等を含む組換えDNA技術は、例えば、J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989、及びShort Protocols In Molecular Biology, Third Edition, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.に記載されるものを利用することができる。

ベクターの種類は特に限定されないが、このベクターによって形質転換される宿主の種類に応じて選択される。ベクターとしては、原核または真核生物宿主細胞において自律複製可能または染色体中に相同組換え可能なベクターを使用することができる。プラスミド、ファージを含むウイルス、コスミドなどである。ベクターは、選択マーカー、複製開始点、ターミネーター、ポリリンカー、エンハンサー、リボゾーム結合部位などを適宜含むことができる。細菌、真菌、酵母、動物、植物などの原核および真核生物用の種々のベクターが市販されているか、あるいは、文献等に記載されており、これらを利用して本発明のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子のアンチセンスRNAをコードするDNA又は組換えDNAをベクターに導入することができる。

DNA導入は、例えば、J. Sambrookら（上記）に記載される技術を使用して実施することができる。なお、本発明のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子のアンチセンスRNAをコードするDNA又は組換えDNAをベクターに導入するにあたっては、上述のように、転写によりセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子の

アンチセンスRNAが生成するように導入する。

本方法の第3の工程においては、前記ベクターを用いた形質転換を行い、セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞を調製する。

ここで宿主細胞は、担子菌、真菌類、酵母類を含む菌類だけではなく、他の真核細胞（動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、藻類など）や原核細胞（細菌、藍藻など）であっても、本発明のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子のアンチセンスRNAをコードするDNAの発現においてプロモーター活性を発揮できるならば、いずれの宿主細胞も使用可能である。このうち、好ましい宿主細胞は担子菌であり、特に好ましくはコリオラス・ヒルスタスである。例えば、具体的には、後述の実施例に記載されているコリオラス・ヒルスタスのオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ活性を欠損している栄養要求性変異株 OJI-1078 (FERM BP-4210) を宿主として使用できる。

形質転換法としては、塩化カルシウム／PEG法、リン酸カルシウム法、酢酸リチウム法、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、スフェロプラスト法、リポフェクション法、アグロバクテリウム法などを例示できるが、これらに限定されない。

本方法の第4の工程においては、前記セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞を木材チップに接種して処理する。

本明細書において「木材チップ」とは、木材を機械的に2～3cmの大きさに小片化したものであり、マツ、スギ、モミ、トウヒ、ダグラスファー、ラジアータパイン等の針葉樹及びブナ、カバ、ハンノキ、カエデ、ユーカリ、ポプラ、アカシア、ラワン、ゴム等の広葉樹を含む木材から得られ、パルプ等の原料として用いることができるものであればいずれの材種のチップをも用いることができる。

木材チップはセルロース分解酵素活性抑制宿主細胞で処理する。セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞が十分に生育するのであれば、木材チップは前処理なくそのまま用いることができるが、他の微生物を殺菌する前処理を実施した方がセルロース分解酵素活性抑制宿主細胞が生育しやすいのであれば、オートクレーブやスチーミング等を用いて殺菌の前処理を行うのが好ましい。

木材チップをセルロース分解酵素活性抑制宿主細胞で処理する温度は10～6

0℃が好ましく、さらに好ましくは20～30℃である。木材チップ中の水分は20～80%、好ましくは30～50%とするのが良い。木材チップへの空気供給量はセルロース分解酵素活性抑制宿主細胞が十分に生育可能であれば必要ないが、通常、対チップ容積1Lあたりに供給する空気量が毎分0.001～1L/(1・min) (以下、空気供給量の単位L/(1・min)をvvmと称する)とするのが良く、好ましくは、対チップ容積当たり0.01vvm～0.1vvmである。

セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞の木材チップへの接種量は、パルプ収率や紙力を軽減することがない限り、適宜設定することができる。

セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞は、滅菌水とともに粉碎し、木材チップに対して植菌して培養することができるが、木材チップに培地を添加して処理してもよい。培地は、セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞が生育できるのであればいずれの培地をも用いることができる。例えば、炭素源としては、グルコース、セロビオース、非晶性セルロース等を使用することができる。また、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、各種アミノ酸、大豆、コーンステープリカー、各種無機窒素などの窒素化合物を用いることができる。さらに、必要に応じて、各種塩類やビタミン、ミネラル等を適宜用いることができる。

セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞によって処理した木材チップは、サーモメカニカルパルプ (TMP)、グラウンドパルプ (GP)、リファイナードグラウンドパルプ (RGP) などの機械パルプにおいては解繊エネルギーの減少や紙力の増加が認められ、クラフトパルプやサルファイトパルプなどの化学パルプの製造においては蒸解性の向上や紙力の増加が得られる。

さらに、本発明の方法において利用するセルロース分解酵素活性抑制宿主細胞は、適当な培地で培養し、生成したセルロース分解酵素を回収することを含んで成るセルロース分解酵素の製造においても有用である。

この場合、セルロース分解酵素は、シグナルペプチドとの融合形態で発現・翻訳されるときには分泌形態で産生され、培地から直接単離することができるが、一方、セルロース分解酵素が非分泌形態で産生されるときには、細胞を分離し、超音波処理、ホモゲナイジング等の処理により細胞を破壊して抽出液を得、この抽出液からセルロース分解酵素を単離することができる。単離・精製は、溶媒抽



出、塩析、脱塩、有機溶媒沈殿、限外濾過、イオン交換、疎水性相互作用、HPLC、ゲル濾過およびアフィニティークロマトグラフィー、電気泳動、クロマトフォーカシングなどの方法を単独にまたは組み合わせて行うことができる。

例えば、本発明のセルロース分解酵素遺伝子上流に GPD プロモーター、ras プロモーターを連結し、組換えDNA技術により、セルロース分解酵素を大量に生産することができる。前記プロモーターは、例えば、コリオラス・ヒルスタス由来 GPD プロモーター遺伝子を含む大腸菌組換え体である E. coli JM109/pCHGP (FERM P-15015)、コリオラス・ヒルスタス由来 ras プロモーター遺伝子を含む大腸菌組換え体である E. coli DH5 $\alpha$ /pCHRAS (FERM P-17352) から調製することが可能である。

本発明の方法において用いられるセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子によってコードされるタンパク質（セロビオースデヒドロゲナーゼ）は、以下の理化学的性質を有する。

#### ①作用

Method in Enzymology (Wood et al, Vol160, Academic press, INC. California) に記載の方法により、セロビオースデヒドロゲナーゼ活性を測定した。すなわち、ジクロロフェノールインドフェノール（シグマ社製）、セロビオース（関東化学株式会社製）を、それぞれ 0.33mM、0.67mM となるように溶解した pH 5、50mM の酢酸緩衝液にセロビオースデヒドロゲナーゼを添加し、37℃にて反応させた。反応開始後、ジクロロフェノールインドフェノールの極大吸収波長 550nm における吸光度（光路長 1cm）を連続的に測定したところ、図 1 に示すような結果を得た。

図 1 に示されるようにセロビオースデヒドロゲナーゼの還元反応によりジクロロフェノールインドフェノールの減少が観察された。反応系からセロビオース、セロビオースデヒドロゲナーゼのいずれかが欠如してもジクロロインドフェノールの減少が観察されないこと、ジクロロインドフェノールの代替品としてシトロム C や Mn(III) マロン酸錯体を用いても同様に還元反応が観察されることから、本酵素はセロビオースデヒドロゲナーゼであることは明らかである。

#### ②力価の測定方法

セロビオースデヒドロゲナーゼ活性測定は次のように行った。0.67mM ジクロロフェノールインドフェノール（シグマ社製）、3.33mM セロビオース（関東化学株式会社製）、pH 5、250mM の酢酸緩衝液をそれぞれ 250ul、100ul、100ul を混合した溶液に被検液 50ul を添加し、37℃にて反応させた。反応開始後、ジクロロフェノールインドフェノールの極大吸収波長 550nm（モル吸光係数 3965L/mol/cm）における吸光度（光路長 1cm）を連続的に測定した。セロビオースデヒドロゲナーゼの活性単位については上記の条件で 1 分間に 1umol のジクロロフェノールインドフェノールを減少させる酵素量を 1unit（ユニット：U）とした。

### ③基質特異性

セロビオース、セロオリゴ糖の他、セルロースを含有するアビセル、広葉樹クラフトパルプに作用する。

### ④至適 pH 及び安定 pH 範囲

反応至適 pH 及び pH 安定性を、グリシン-HCl 緩衝液（pH 2～4）、酢酸緩衝液（pH 4～6）、リン酸緩衝液（pH 6～8）を用いて測定した。それぞれの pH で酵素活性を測定した。結果を図 2 に示す。

図 2 により、酵素反応の至適 pH は 4～6 であった。また、それぞれ 50mM の所定緩衝液中に 4℃で 24 時間保持した後に酵素活性を測定した。結果を図 3 に示す。本酵素は pH 2～5 で安定であった。

### ⑤作用適温の範囲

反応温度を変えて各酵素の酵素活性を測定した。結果を図 4 に示す。本酵素は 20～40℃において高い活性を示した。また、所定の温度で 50mM 酢酸緩衝液（pH 5）中に各酵素を 30 分放置した後に酵素活性を測定した。結果を図 5 に示す。

図 5 より 40℃、30 分の処理で約 80% 以上の酵素活性を保持し、50℃、30 分の処理でも約 30% 以上の残存活性を示す。

### ⑥等電点

SERVA 社製 PRECOAT pH 3～10 による等電点電気泳動を行った結果、等電点は 4.2 であった。

### ⑦分子量

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定し、約 91,700 であった。

## ⑧金属イオン、阻害剤の影響

種々の金属塩、阻害剤など種々の物質を 1mM になるように酵素液に添加して、4℃で一晩保持した後、反応液中にも同種の金属塩を 1mM になるように添加して酵素活性を測定した。結果を表 1 に示す。表 1 よりアジ化ナトリウム、EDTA により弱く阻害を受け、 $\text{Hg}^{2+}$ 、SDS により強く阻害された。

表 1

| 金属塩 (1mM)       | 相対活性 (%) |
|-----------------|----------|
| なし              | 100      |
| $\text{FeSO}_4$ | 0        |
| $\text{ZnSO}_4$ | 72       |
| $\text{CuSO}_4$ | 82       |
| $\text{BaCl}_2$ | 71       |
| $\text{MgCl}_2$ | 64       |
| $\text{CaCl}_2$ | 65       |
| $\text{CoCl}_2$ | 53       |
| $\text{MnCl}_2$ | 35       |
| $\text{AlCl}_3$ | 23       |
| $\text{HgCl}_2$ | 0        |
| $\text{NiCl}_2$ | 60       |
| $\text{LiCl}_2$ | 45       |
| $\text{ZnCl}_2$ | 32       |
| $\text{CuCl}_2$ | 53       |
| $\text{NaN}_3$  | 46       |
| EDTA            | 45       |
| SDS             | 0        |

これに対し、従来公知のセロビオースデヒドロゲナーゼとしては以下の報告が

ある。

Henriksson らはファネロケエテ・クリソスポリウム由来の反応至適 pH が 5.0、等電点が 4.2 付近、分子量が 89,000 であるセロビオースデヒドロゲナーゼを報告しているが (Eur. J. Biochem., 196(1991) 101-106)、該セロビオースデヒドロゲナーゼの反応至適温度は 50°C である。

Roy らはトラメテス・ベルシコラ由来の反応至適 pH が 5.0、等電点が 4.2 付近、分子量が 97,000 であるセロビオースデヒドロゲナーゼを報告しているが (Appl. Environ. Microbiol., 62(1996) 4417-4427)、該セロビオースデヒドロゲナーゼの反応至適温度は 50°C である。

Fang らはスキゾフィラム・コミュネ由来のセロビオースデヒドロゲナーゼを報告しているが (Arch. Biochem. Biophys., 353-1(1998) 37-46)、該セロビオースデヒドロゲナーゼの反応至適 pH は 4.5、分子量は 102,000 であり、至適温度、等電点の記載はない。

Schmidhalter、Canevascini らはコネオフォラ・プテアナ由来の等電点が 3.9 付近であるセロビオースデヒドロゲナーゼを報告しているが (Arch. Biochem. Biophys., 300-2(1993) 559-563)、該セロビオースデヒドロゲナーゼの反応至適 pH は 4.0、分子量は 111,000 であり、反応至適温度の記載はない。

Canevascini らはミセリオプトレ・サーモフィラ由来の等電点が 4.1 付近、分子量が 91,000 であるセロビオースデヒドロゲナーゼを報告しているが (Eur. J. Biochem., 198(1991) 43-52)、該セロビオースデヒドロゲナーゼの反応至適 pH は 7.0 であり、反応至適温度の記載はない。

Shou らはフミコーラ・インソレンス由来の等電点が 4.0 付近、分子量が 92,000 であるセロビオースデヒドロゲナーゼを報告しているが (Biochem. J., 330(1991) 565-571)、該セロビオースデヒドロゲナーゼの反応至適 pH は 7.0、反応至適温度 65°C である。

上記のように、本発明の方法において用いられるセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子がコードするセロビオースデヒドロゲナーゼは、至適温度、至適 pH、分子量、等電点において公知のセロビオースデヒドロゲナーゼとは異なることから、新規なセロビオースデヒドロゲナーゼであると認定した。なお、公知のセロビオ

ースデヒドロゲナーゼの理化学的性質を表 2 に示す。

表 2

|                                    | 分子量(kD) | 等電点  | 至適pH | 至適温度(°C) |                                |
|------------------------------------|---------|------|------|----------|--------------------------------|
|                                    |         |      |      |          | Eur. J. Biochem., 196(1991)    |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | 89      | 4.2  | 5.0  | 50       | 101-106                        |
|                                    |         |      |      |          | Appl. Environ. Microbiol.,     |
| <i>Trametes versicolor</i>         | 97      | 4.2  | 5.0  | 50       | 62(1996) 4417-4427             |
|                                    |         |      |      |          | Arch. Biochem. Biophys.,       |
| <i>Schizophyllum commune</i>       | 102     | 記載無し | 4.5  | 記載無し     | 353-1(1998) 37-46              |
|                                    |         |      |      |          | Arch. Biochem. Biophys.,       |
| <i>Conephora puteana</i>           | 111     | 3.9  | 4.0  | 記載無し     | 300-2(1993) 559-563            |
|                                    |         |      |      |          | Eur. J. Biochem., 198(1991)    |
| <i>Myceliophthora thermophila</i>  | 91      | 4.1  | 7.0  | 記載無し     | 43-52                          |
| <i>Humicola insolens</i>           | 92      | 4.0  | 7.0  | 65       | Biochem. J., 330(1991) 565-571 |

セロビオースデヒドロゲナーゼの生産能を有するコリオラス・ヒルスタスは特に限定されないが、例えば、コリオラス・ヒルスタス IF0 4917 株を利用することができる。

コリオラス・ヒルスタス由来のセロビオースデヒドロゲナーゼは、例えば、セロビオースデヒドロゲナーゼを生産するコリオラス・ヒルスタスを培地に培養し、得られる培養物からセロビオースデヒドロゲナーゼを採取することによって得られる。上記のコリオラス・ヒルスタスを培養する培地としては、該菌が増殖可能な培地であればいずれの組成の培地をも利用可能である。培地の栄養源としては、コリオラス・ヒルスタスの培養に通常用いられているものを広く用いることができる。炭素源としては同化可能なものであれば良く、グルコース、パルプ、結晶性セルロース等を使用することができる。窒素源としては利用可能な窒素化合物であれば良く、例えば、酵母エキス、ペプトン、各種アミノ酸、大豆、コンステ

イープリカー、各種無機窒素などを用いることができる。その他、必要に応じて、各種の塩類やビタミン、ミネラル等を適宜用いることができる。

培養温度及びpHは、コリオラス・ヒルスタスが増殖可能な範囲において適宜設定可能である。例えば、培養温度は20～55℃、好ましくは25～30℃であり、pHは3～9、好ましくは4～6である。

コリオラス・ヒルスタス由来のセロビオースデヒドロゲナーゼは、上記条件におけるコリオラス・ヒルスタスの培養によって培養液中に分泌生産されるので、培養後の培養物から本酵素を採取する。培養物から採取した溶液をそのままセロビオースデヒドロゲナーゼ粗酵素液として使用することができるが、塩析、限外濾過、凍結乾燥により、セロビオースデヒドロゲナーゼを濃縮又は固体化することもできる。さらに、硫酸分画、ゲル濾過による分子量分画や各種イオン交換樹脂、ハイドロキシアパタイト、疎水クロマトグラム、等電点分画等を行うことによって精製することができるが、これらの方法は繰り返すことも可能であり、さらに必要に応じて他の精製手段を組み合わせることもできる。

#### 【実施例】

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されない。

##### 〔実施例1〕 コリオラス・ヒルスタス由来染色体DNAライブラリーの作製

コリオラス・ヒルスタス IF0 4917 株の平板寒天培養から直径5mmの寒天片をコルクボーラーで打ち抜き、グルコース・ペプトン培地（グルコース2%、ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$  0.05%、リン酸でpH4.5に調製）200mlに植菌し、28℃で7日間回転震盪を行った。培養後菌体を集菌後、1Lの滅菌水で菌体を洗浄し、液体窒素で凍結した。

この凍結菌体5gを乳鉢を用いて粉砕した。粉砕した菌体を遠心管に移し、溶菌緩衝液（100mM トリス（pH8）、100mM EDTA、100mM NaCl、さらにプロテイナーゼKを100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加）10mlを加え、55℃で3時間インキュベートした。インキュベート後、フェノール処理、クロロホルム処理を行い、水層部分にエタノール徐々に添加しDNAが析出したところで染色体DNAを巻取り、TE溶液に懸濁した。

得られた染色体DNA 100  $\mu$ g を制限酵素 Sau3AI で部分分解し、5～20%ショ糖密度勾配超遠心分離 (30,000rpm, 18 時間) により分画し、20～40kbp 断片区分を集めた。この断片区分を東洋紡社製ファージ  $\lambda$  EMBL3-Bam<sub>I</sub> アームに T4 DNA リガーゼを用いて連結し、得られたファージDNA を STRATAGENE 社製ギガバックゴールドを用いてパッケージング後、大腸菌 P 2329 株に感染せしめ染色体DNA ライブラリーとした。

〔実施例 2〕 染色体DNA ライブラリーからのセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子の単離

上記染色体DNA ライブラリーからプラークハイブリダイゼーションによりセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むクローンの選抜を行った。この一連の操作は常法 (Sambrook ら著、Molecular Cloning A Laboratory Manual/2nd Edition(1989)) によった。プラークハイブリダイゼーションに用いたプローブは次の配列を持つ合成オリゴマーをアマシャム社製のオリゴDNA 標識キットを用い 3' 末端をフルオレセインで標識したものである。

5' -TA(T/C)GA(A/G)AA(T/C)AA(A/G)ATT(T/C/A)TT(T/C/A/G)-3' (配列番号 5)

その結果、約 40,000 個のプラークの中から 4 個の陽性クローンを選抜することができた。陽性クローンから常法に従って調製した組換え体ファージDNA を各種制限酵素で消化し、上記の合成DNA を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、制限酵素 XhoI で消化して得られた断片中に 5.3kbp、7.2kbp の DNA バンドとしてプローブにハイブリダイズするそれぞれ異なるクローンが認められた。

上記DNA 断片 7.2kbp、5.3kbp をアガロースゲル電気泳動法により切り出し、大腸菌ベクターpBluescriptII SK+ の XhoI サイトにサブクローニング化し、大腸菌 JM109 株へ形質転換した。サブクローニング化したDNA を大量に調製し、超遠心操作 (50,000rpm、16h、15℃) で精製し、塩基配列を決定した。塩基配列の決定は United States Biochemical 社製のシーケンシングキットを用いて行った。

塩基配列を配列番号 1 及び 3 に示す。その結果、上記塩基配列範囲内においてコリオラス・ヒルスタス由来のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子は 15 個の

イントロンにより分断されていた。また、それらの塩基配列から各々推定されるアミノ酸配列（配列番号 2 及び 4）は、これまで報告されているセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子と高い類似性が認められた。

〔実施例 3〕 染色体 DNA ライブラリーからのセロビオヒドロラーゼ I-1 遺伝子の単離

実施例 2 と同様にブランクハイブリダイゼーションを行い、用いたプローブは他生物種から単離されているセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子の塩基配列の基づいて作製した次の配列を持つ合成オリゴマーをアマシャム社製のオリゴ DNA 標識キットを用い 3' 末端をフルオレセインで標識したものである。

5' -GA(T/C)ATCAAGTT(T/C)ATC(A/G)ATGG-3' （配列番号 6）

その結果、約 40,000 個のブランクの中から 2 個の陽性クローンを選抜することができた。陽性クローンから常法に従って調製した組換え体ファージ DNA を各種制限酵素で消化し、上記の合成 DNA を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、制限酵素 PstI ならびに NheI で消化して得られた断片中に単一の DNA バンドとして 3.9 kbp にハイブリダイズするクローンが認められた。

上記 DNA 断片 3.9 kbp をアガロースゲル電気泳動法により切り出し、大腸菌ベクター pBluescriptsII SK- の PstI-SpeI サイトにサブクローン化し、大腸菌 JM109 株へ形質転換し、コリオラス・ヒルスタス由来のセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子-1 を含むプラスミド pCHCBHI26 を得た。サブクローン化した DNA 断片の塩基配列を決定した。

塩基配列を配列番号 7 に示す。その結果、上記塩基配列の範囲内においてコリオラス・ヒルスタス由来セロビオヒドロラーゼ I-1 遺伝子は 2 つのイントロンにより分断されていた。また、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号 8 に示す。

〔実施例 4〕 染色体 DNA ライブラリーからのセロビオヒドロラーゼ I-2 遺伝子の単離

実施例 2 と同様にブランクハイブリダイゼーションを行い、用いたプローブは実施例 3 で用いた配列番号 6 の塩基配列を持つ合成オリゴマーをアマシャム社製のオリゴ DNA 標識キットを用い 3' 末端をフルオレセインで標識したものであ



る。

その結果、約 40,000 個のプラークの中から 3 個の陽性クローンを選抜することができた。陽性クローンから常法に従って調製した組換え体ファージ DNA を各種制限酵素で消化し、上記の合成 DNA を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、制限酵素 SalI で消化して得られた断片中に単一の DNA バンドとして 4.2 kbp にハイブリダイズするクローンが認められた。

上記 DNA 断片 4.2 kbp をアガロースゲル電気泳動法により切り出し、大腸菌ベクター pUC19 の SalI サイトにサブクローン化し、大腸菌 JM109 株へ形質転換し、コリオラス・ヒルスタス由来のセロビオヒドロラーゼ I-2 遺伝子を含むプラスミド pCHCBHI27 を得た。サブクローン化した DNA 断片の塩基配列を決定した。

塩基配列を配列番号 9 に示す。その結果、上記塩基配列の範囲内においてコリオラス・ヒルスタス由来セロビオヒドロラーゼ I-2 遺伝子は 2 つのイントロンにより分断されていた。また、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号 10 に示す。

〔実施例 5〕 染色体 DNA ライブラリーからのセロビオヒドロラーゼ I-3 遺伝子の単離

実施例 2 と同様にプラークハイブリダイゼーションを行い、用いたプローブは実施例 3 で用いた配列番号 6 の塩基配列を持つ合成オリゴマーをアマシャム社製のオリゴ DNA 標識キットを用い 3' 末端をフルオレセインで標識したものである。

その結果、約 40,000 個のプラークの中から 2 個の陽性クローンを選抜することができた。陽性クローンから常法に従って調製した組換え体ファージ DNA を各種制限酵素で消化し、上記の合成 DNA を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、制限酵素 EcoRI ならびに BamHI で消化して得られた断片中に単一の DNA バンドとして 4.6 kbp にハイブリダイズするクローンが認められた。

上記 DNA 断片 4.6 kbp をアガロースゲル電気泳動法により切り出し、大腸菌ベクター pUC19 の EcoRI-BamHI サイトにサブクローン化し、大腸菌 JM109 株へ形質転換し、コリオラス・ヒルスタス由来のセロビオヒドロラーゼ I-3 遺伝子を

含むプラスミド pCHCBHI31 を得た。サブクローン化した DNA 断片の塩基配列を決定した。

塩基配列を配列番号 1 1 に示す。その結果、上記塩基配列の範囲内においてコリオラス・ヒルスタス由来セロビオヒドロラーゼ I - 3 遺伝子は 2 つのイントロンにより分断されていた。また、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号 1 2 に示す。

[実施例 6] 染色体 DNA ライブラリーからのセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子の単離

実施例 2 と同様にブランクハイブリダイゼーションを行い、用いたプローブは他生物種から単離されているセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子の塩基配列の基づいて作製した次の配列を持つ合成オリゴマーをアマシャム社製のオリゴ DNA 標識キットを用い 3' 末端をフルオレセインで標識したものである。

5' -CAGTGGGGIGACTGGTGCAAC-3' (配列番号 1 3)

その結果、約 100,000 個のブランクの中から 8 個の陽性クローンを選抜することができた。陽性クローンから常法に従って調製した組換え体ファージ DNA を各種制限酵素で消化し、上記の合成 DNA を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、制限酵素 EcoRV ならびに NcoI で消化して得られた断片中に単一の DNA バンドとして 5.0 kbp にハイブリダイズするクローンが認められた。

上記 DNA 断片を回収するため、制限酵素 NcoI で消化後 Klenow fragment により平滑化し、さらに EcoRV で消化することにより得られる 5.0 kbp の DNA 断片をアガロースゲル電気泳動法により切り出し、大腸菌ベクター pUC19 の SmaI サイトにサブクローン化し、コリオラス・ヒルスタス由来のセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子を含むプラスミド pCHCBHII を得た。このプラスミドを大腸菌 JM109 株へ形質転換した。また、前記のサブクローン化した DNA 断片の塩基配列を決定した。

塩基配列を配列番号 1 4 に示す。その結果、上記塩基配列の範囲内においてコリオラス・ヒルスタス由来セロビオヒドロラーゼ II 遺伝子は 6 つのイントロンにより分断されていた。また、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号 1 5 に示す。

### 〔実施例 7〕 コリオラス・ヒルスタス cDNA ライブラリーの作製

乾燥重量 6g を直径 9.5cm のガラスシャーレに入れ 121℃、15 分で滅菌したユーカリ・グロブラスのチップにペプトン培地(ポリペプトン 1.0%、酵母エキス 0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$  0.05%、リン酸で pH 4.5 に調製) 20ml 添加した培地へ、コリオラス・ヒルスタス IFO 4917 株の平板寒天培養から直径 5mm の寒天片をコルクボーラーで打ち抜き、3 片を植菌し、30℃で 10 日間静置培養を行った。培養後菌体を集菌後、液体窒素で凍結した。

この凍結菌体を用いてグアニジン塩酸法による全 RNA の回収を行い、次いで宝酒造製の Oligotex - dT<sup><super></sup> mRNA Purification kit を用いて、poly(A)<sup>+</sup>RNA を調製した。さらに STRATAGENE 社製の cDNA Synthesis kit を用いて cDNA を合成し、5' 側に EcoRI サイト、また 3' 側に XhoI サイトを付加し、 $\lambda$  ZAPII ベクターの EcoRI-XhoI サイトへ挿入し、in vitro packaging kit により cDNA ライブラリーとした。

### 〔実施例 8〕 コリオラス・ヒルスタス cDNA ライブラリーからの糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子の単離

実施例 7 で作製した cDNA ライブラリー液をシャーレ上でプラークが単離できるように適当に希釈し *Eschericia coli* XL1 Blue MRF' 株へ感染させ、37℃で 1 晩培養することにより、プラークを形成させた。得られたシングルプラークを SM バッファーに懸濁し、シークエンス用ユニバーサルプライマーである M13(-20) プライマー (GTAAAACGACGGCCAGT : 配列番号 16) 並びに M13 Reverse プライマー (GGAAACAGCTATGACCATG : 配列番号 17) を用いて PCR 反応を行い、cDNA 断片を増幅した。このようにして得られた cDNA 断片をランダムに塩基配列の解析を行った。その結果、糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼをコードする cDNA 遺伝子を見出した。塩基配列を配列番号 18 に、また推定されるアミノ酸配列を配列番号 19 に示す。

### 〔実施例 9〕 コリオラス・ヒルスタス cDNA ライブラリーからの糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子の単離

実施例 7 で作製した cDNA ライブラリー液をシャーレ上でプラークが単離できるように適当に希釈し *Eschericia coli* XL1 Blue MRF' 株へ感染させ、37℃で 1

晩培養することにより、プラークを形成させた。得られたシングルプラークを S Mバッファーに懸濁し、シークエンス用ユニバーサルプライマーである M13(-20)プライマー (GTAAACGACGGCCAGT: 配列番号 16) 並びに M13 Reverse プライマー (GGAAACAGCTATGACCATG: 配列番号 17) を用いて PCR 反応を行い、cDNA 断片を増幅した。このようにして得られた cDNA 断片をランダムに塩基配列の解析を行った。その結果、糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼをコードする cDNA 遺伝子を見出した。塩基配列を配列番号 20、また推定されるアミノ酸配列を配列番号 21 に示す。

〔実施例 10〕担子菌ファネロケエテ・クリソスポリウム染色体 DNA からの糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子の単離

グルコース・ペプトン培地 (グルコース 2%、ポリペプトン 0.5%、酵母エキス 0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$  0.05%、リン酸で pH4.5 に調製) 100ml の培地へ、ファネロケエテ・クリソスポリウム ATCC 34541 株の平板寒天培養から直径 5mm の寒天片をコルクボーラーで打ち抜き、5 片を植菌し、30°C で 5 日間振盪培養を行った。培養後菌体を集菌し、液体窒素で凍結した。この凍結菌体 5g を乳鉢を用いて粉砕した。粉砕した菌体を遠心管に移し、溶菌緩衝液 (100mM トリス (pH8)、100mM EDTA、100mM NaCl、さらにプロテイナーゼ K を 100  $\mu\text{g/ml}$  となるように添加) 10ml を加え、55°C で 3 時間インキュベートした。インキュベート後、フェノール処理、クロロホルム処理を行い、水層部分にエタノール徐々に添加し DNA が析出したところで染色体 DNA を巻取り、TE 溶液に懸濁し、ファネロケエテ・クリソスポリウム染色体 DNA 溶液とした。

次に以下に示す 2 つの DNA プライマーを用いて、上記ファネロケエテクリソスポリウム染色体 DNA 溶液に対し、PCR 反応を行い、糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ染色体遺伝子を得た。

5' -ATGAAGTTACTTCTTGCTCTC-3' (配列番号 22)

5' -TCACAGGAAGGGTTCGAGTGC-3' (配列番号 23)

得られた塩基配列を配列番号 24 に示す。その結果、上記塩基配列の範囲内においてファネロケエテ・クリソスポリウム由来糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子は 15 個のイントロンにより分断されていた。また、

塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号 25 に示す。

〔実施例 11〕担子菌ファネロケエテ・クリソスポリウム染色体 DNA からの糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子の単離

実施例 10 で調製したファネロケエテ・クリソスポリウム由来の染色体 DNA 溶液に対して、以下に示す 2 つの DNA プライマーを用いて、上記ファネロケエテ・クリソスポリウム染色体 DNA 溶液に対し、PCR 反応を行い、糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ染色体遺伝子を得た。

5' -ATGATACCTCTCCGCTCTGC-3' (配列番号 26)

5' -TATCTTCCTGATGCGATTCC-3' (配列番号 27)

得られた塩基配列を配列番号 28 に示す。その結果、上記塩基配列の範囲内においてファネロケエテ・クリソスポリウム由来糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子は 7 個のイントロンにより分断されていた。また、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号 29 に示す。

〔実施例 12〕コリオラス・ヒルスタス由来グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーターによるコリオラス・ヒルスタス由来セロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現ベクターの構築

コリオラス・ヒルスタスのプロモーターの下流にセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子の構造遺伝子領域を連結し、本来のセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子からグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーター領域に置換しセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子発現ベクターとした。

具体的にはグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ染色体遺伝子 EcoRI 及び BamHI 消化により得られる 3.8 kbp の DNA 断片 (断片 1) を得た。ファージベクター M13mp18 の EcoRI、BamHI サイトに T4 DNA リガーゼを用いて前記断片 1 を連結し、これを大腸菌 JM109 株に形質転換し、一本鎖ファージ DNA を調製した。

次に、配列番号 30 に示す DNA プライマーを合成し、上記一本鎖ファージ DNA にアニーリングを行い、プライマー伸長法により GPD 遺伝子のプロモーター領域だけを合成し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で切断することにより 0.9 kbp の DNA 断片 (断片 2) を調製した。

5' -CATGGTGTGTGGTGGATG-3' (配列番号 30)

一方、セロビオースデヒドロゲナーゼの成熟型酵素をコードしている遺伝子領域だけを取り出すため、プラスミド pCHCDH1 を鋳型にし、配列番号 31、32 に示すプライマーで PCR 反応により伸長させ約 3.5 kbp の DNA 断片を得た (断片 3)。

5' -AAGTTCAAGAGTCTCCTGT-3' (配列番号 31)

5' -GGTACAGTACTTATCTGTAT-3' (配列番号 32)

大腸菌ベクターの pUC18 を制限酵素 EcoRI と SmaI (宝酒造社製) で切断し、上記 2 種類の DNA 断片を混合して、T4DNA リガーゼで連結した後、大腸菌 JM109 株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片の 2 及び 3 の 2 種類の DNA 断片が同時に挿入されているプラスミドを単離し、これを pGPCHD1 と命名した。

[実施例 13] セロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子のアンチセンス配列を有するプラスミドの構築

実施例 12 と同様の方法を用いグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーター領域 0.9 kbp 断片 2 を得た。得られた断片 2 を pUC18 の EcoRI-SmaI サイトへ T4DNA リガーゼにより連結した後、大腸菌 JM109 株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片の 2 が挿入されているプラスミドを単離し、これを pCHGP1 と命名した。この pCHGP1 を制限酵素 NcoI-XbaI で消化し、ベクター部分を調製した (断片 4)。

また、コリオラス・ヒルスタス由来セロビオースデヒドロゲナーゼ 1 遺伝子を含むプラスミド pCHCDH1 から以下に示す 2 つのプライマー (配列番号 33、34) を用いて PCR 法により、コリオラス・ヒルスタス由来セロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子の 8 番目のエクソンを含む約 650 bp の DNA 断片を PCR 法により増幅し、制限酵素 XbaI と NcoI で消化した DNA 断片を得た (断片 5)。

5' -TCTAGATTTACTGGTACCCCAACAACAATG-3' (配列番号 33)

5' -CCATGGGTTGATCGACGGGTTGTCAGACACG-3' (配列番号 34)

上記断片 4 と断片 5 を混合して、T 4 DNA リガーゼで連結した後、大腸菌 J M 1 0 9 株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片 5 の DNA 断片が挿入されているプラスミドを単離し、これを p G P a n t i C D H 1 と命名した。この p G P a n t i C D H 1 を制限酵素 X b a I と H i n d I I I で消化し、ベクター部分とした（断片 6）。

次に、コリオラス・ヒルスタス由来マンガンパーオキシダーゼ遺伝子を含むプラスミド pBSMPOG1 (FERM P-14933) を以下に示す 2 つのプライマー（配列番号 3 5、3 6）を用いて P C R 法によりマンガンパーオキシダーゼの C 末側非翻訳領域の増幅を行い、制限酵素 X b a I と H i n d I I I で消化し、約 1 k b の DNA 断片を得た（断片 7）。

5' -TCTAGAGTCACCTCCGT-3' （配列番号 3 5）

5' -AAGCTTGGGTACTGTG-3' （配列番号 3 6）

上記断片 6 と断片 7 を混合して、T 4 DNA リガーゼで連結した後、大腸菌 J M 1 0 9 株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片 7 の DNA 断片が順方向で挿入されているプラスミドを単離し、これを p G P C D H A M と命名した。

〔実施例 1 4〕 コリオラス・ヒルスタス由来セロビオヒドロラーゼ I 遺伝子のアンチセンス配列を有するプラスミドの構築

実施例 1 3 で得られたプラスミド p G P C D H A M を制限酵素 N c o I と X b a I で消化し、ベクター部分の DNA 断片を調製した（断片 8）。次に、実施例 3 で得られたコリオラス・ヒルスタス由来のセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子を含むプラスミド pCHCBHI26 に対し、次に 2 つのプライマーを用いて P C R 反応を行い、約 7 5 0 b p の DNA 断片を増幅した後、制限酵素 N c o I と X b a I で消化することにより DNA 断片を得た（断片 9）。

5'-TCTAGAGCCAACCTCGAGGGGTGG-3' （配列番号 3 7）

5'-CCATGGGAACGTCGAGCCGATGGG-3' （配列番号 3 8）

上記断片 8 と断片 9 を混合して、T 4 DNA リガーゼで連結した後、大腸菌 J M 1 0 9 株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片 9 の DNA 断片が挿入されているプラスミドを単離し、これを p G P C B H I 2 6

AMと命名した。

〔実施例 15〕 コリオラス・ヒルスタス由来セロビオヒドロラーゼ I 遺伝子のアンチセンス配列を有するプラスミドの構築

実施例 13 で得られたプラスミド pGPCDHAM を制限酵素 NcoI と XbaI で消化し、ベクター部分の DNA 断片を調製した (断片 8)。次に、実施例 4 で得られたコリオラス・ヒルスタス由来のセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子を含むプラスミド pCHCBHI27 に対し、次に 2 つのプライマーを用いて PCR 反応を行い、約 750 bp の DNA 断片を増幅した後、制限酵素 NcoI と XbaI で消化することにより DNA 断片を得た (断片 10)。

5'-TCTAGAGCCAACGTCCTCGGCTGG-3' (配列番号 39)

5'-CCATGGGTAGGTCGAGCCGATGGG-3' (配列番号 40)

上記断片 8 と断片 10 を混合して、T4 DNA リガーゼで連結した後、大腸菌 JM109 株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片 10 の DNA 断片が挿入されているプラスミドを単離し、これを pGPCBHI27AM と命名した。

〔実施例 16〕 コリオラス・ヒルスタス由来セロビオヒドロラーゼ I 遺伝子のアンチセンス配列を有するプラスミドの構築

実施例 13 で得られたプラスミド pGPCDHAM を制限酵素 NcoI と XbaI で消化し、ベクター部分の DNA 断片を調製した (断片 8)。次に、実施例 5 で得られたコリオラス・ヒルスタス由来のセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子を含むプラスミド pCHCBHI31 に対し、次に 2 つのプライマーを用いて PCR 反応を行い、約 750 bp の DNA 断片を増幅した後、制限酵素 NcoI と XbaI で消化することにより DNA 断片を得た (断片 11)。

5'-TCTAGAGCCAACGTCCTCGGCTGG-3' (配列番号 41)

5'-CCATGGAGCGTAGGTCGAGCCAATG-3' (配列番号 42)

上記断片 8 と断片 11 を混合して、T4 DNA リガーゼで連結した後、大腸菌 JM109 株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片 11 の DNA 断片が挿入されているプラスミドを単離し、これを pGPCBHI31AM と命名した。



[実施例 17] コリオラス・ヒルスタス由来セロビオヒドロラーゼ II 遺伝子のアンチセンス配列を有するプラスミドの構築

実施例 13 で得られたプラスミド pGPCDHAM を制限酵素 NcoI と XbaI で消化し、ベクター部分の DNA 断片を調製した (断片 8)。次に、実施例 6 で得られたコリオラス・ヒルスタス由来のセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子を含むプラスミド pCHCBHII に対し、次に 2 つのプライマーを用いて PCR 反応を行い、約 600 bp の DNA 断片を増幅した後、制限酵素 NcoI と XbaI で消化することにより DNA 断片を得た (断片 12)。

5'-TCTAGAATCTACCTGAGCCCTTAC-3' (配列番号 43)

5'-CCATGGCTCACTAGTGGCGAGACC-3' (配列番号 44)

上記断片 8 と断片 12 を混合して、T4 DNA リガーゼで連結した後、大腸菌 JM109 株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片 12 の DNA 断片が挿入されているプラスミドを単離し、これを pGPCBHIIAM と命名した。

[実施例 18] コリオラス・ヒルスタス由来ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子のアンチセンス配列を有するプラスミドの構築

実施例 13 で得られたプラスミド pGPCDHAM を制限酵素 NcoI と XbaI で消化し、ベクター部分の DNA 断片を調製した (断片 8)。次に、実施例 12 で得られたコリオラス・ヒルスタス由来の糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ cDNA 遺伝子に対し、次の 2 つのプライマーを用いて PCR 反応を行い、約 600 bp の DNA 断片を増幅した後、制限酵素 NcoI と XbaI で消化することにより DNA 断片を得た (断片 13)。

5'-TCTAGAGCTCACGGTTTCATTCATG-3' (配列番号 45)

5'-CCATGGGGTGTAGAGCCCCGGAATG-3' (配列番号 46)

上記断片 8 と断片 13 を混合して、T4 DNA リガーゼで連結した後、大腸菌 JM109 株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片 13 の DNA 断片が挿入されているプラスミドを単離し、これを pGPEG61AM と命名した。

[実施例 19] コリオラス・ヒルスタス由来ファミリー 12 に属するエンドグル

### カナーゼ遺伝子のアンチセンス配列を有するプラスミドの構築

実施例 13 で得られたプラスミド p G P C D H A M を制限酵素 N c o I と X b a I で消化し、ベクター部分の DNA 断片を調製した (断片 8)。次に、実施例 9 で得られたコリオラス・ヒルスタス由来の糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ c D N A 遺伝子に対し、次の 2 つのプライマーを用いて P C R 反応を行い、約 7 0 0 b p の DNA 断片を増幅した後、制限酵素 N c o I と X b a I で消化することにより DNA 断片を得た (断片 13)。

5'-TCTAGAGCGGGCCCGTACTCGCTC-3' (配列番号 47)

5'-CCATGGGTAATGTGATTCTGTCG-3' (配列番号 48)

上記断片 8 と断片 13 を混合して、T4 DNA リガーゼで連結した後、大腸菌 J M 1 0 9 株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片 13 の DNA 断片が挿入されているプラスミドを単離し、これを p G P E G 1 2 A M と命名した。

[実施例 20] ファネロケエテ・クリソスポリウム由来ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子のアンチセンス配列を有するプラスミドの構築

実施例 13 で得られたプラスミド p G P C D H A M を制限酵素 N c o I と X b a I で消化し、ベクター部分の DNA 断片を調製した (断片 8)。次に、実施例 10 で得られたファネロケエテ・クリソスポリウム由来の糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子に対し、次の 2 つのプライマーを用いて P C R 反応を行い、約 6 0 0 b p の DNA 断片を増幅した後、制限酵素 N c o I と X b a I で消化することにより DNA 断片を得た (断片 15)。

5'-TCTAGAATGAAGTACTTCTTGCTC-3' (配列番号 49)

5'-CCATGGCGTTTGGCGTACCGTCTG-3' (配列番号 50)

上記断片 8 と断片 15 を混合して、T4 DNA リガーゼで連結した後、大腸菌 J M 1 0 9 株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片 14 の DNA 断片が挿入されているプラスミドを単離し、これを p G P P C E G 5 A M と命名した。

[実施例 21] ファネロケエテ・クリソスポリウム由来ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子のアンチセンス配列を有するプラスミドの構築

実施例 13 で得られたプラスミド p G P C D H A M を制限酵素 N c o I と X b a I で消化し、ベクター部分の DNA 断片を調製した (断片 8)。次に、実施例 11 で得られたファネロケエテ・クリソスポリウム由来の糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子に対し、次の 2 つのプライマーを用いて P C R 反応を行い、約 500 b p の DNA 断片を増幅した後、制限酵素 N c o I と X b a I で消化することにより DNA 断片を得た (断片 16)。

5'-TCTAGACCCCGGTACAGACGCCGC-3' (配列番号 51)

5'-CCATGGGATGTTAGGAATGATCTG-3' (配列番号 52)

上記断片 8 と断片 16 を混合して、T4 DNA リガーゼで連結した後、大腸菌 J M 109 株の形質転換を行い、アンピシリン耐性の形質転換株から、上記断片 15 の DNA 断片が挿入されているプラスミドを単離し、これを p G P P C E G 9 A M と命名した。

#### [実施例 22] コリオラス・ヒルスタス形質転換方法

##### a. 一核菌糸体培養

直径 6 mm 前後のガラスビーズを約 30 個入れた 500 ml 容三角フラスコに S M Y 培地 (シュクロース 1 %、麦芽エキス 1 %、酵母エキス 0.4 %) 100 ml を分注して滅菌後、コリオラス・ヒルスタス O J I - 1078 株の平板寒天培地から直径 5 mm の寒天片をコルクボーラーで打ち抜き S M Y 培地に植菌し、28℃で7日間静置培養した (前培養)。ただし、菌糸を細分化するために、1日に1～2回振り混ぜた。次に、1 L 容の三角フラスコに S M Y 培地 200 ml を分注し、さらに回転子を入れ、滅菌後、前培養菌糸をナイロンメッシュ (孔径 30 μ m) で濾集し、全量を植菌し、28℃で培養した。なお、スターラーで1日2時間程度攪拌することにより菌糸を細分化した。この培養を4日間行った。

##### b. プロトプラストの調製

上記液体培養菌糸をナイロンメッシュ (孔径 30 μ m) で濾集し、浸透圧調節溶液 (0.5 M M g S O 4、50 ml マレイン酸バッファー (p H 5.6)) で洗浄した。次に、湿菌体 100 mg あたり 1 ml の細胞壁分解酵素液に懸濁し、緩やかに震盪しながら 28℃で3時間インキュベートしてプロトプラストを遊離させた。細胞壁溶解酵素として、次の市販酵素製剤を組み合わせ使用した。即ち、

セルラーゼ・オノズカ (cellulase ONOZUKA RS) ヤクルト社製 5 m g、ヤタラーゼ (Yatalase) (宝酒造社製) 10 m g を上記浸透圧調節溶液 1 m g に溶解して酵素液として用いた。

#### c. プロトプラストの精製

上記酵素反応液からナイロンメッシュ (孔径 30  $\mu$  m) で菌糸断片を除いた後、プロトプラストの回収率を高めるため、ナイロンメッシュ上に残存する菌糸断片とプロトプラストを上記浸透圧調節溶液で 1 回洗浄した。得られたプロトプラスト懸濁液を遠心分離 (1,000k $\times$  g、5 分間) し、上清を除去し、4 m l の 1 M シュークローズ (20 mM MOPS 緩衝液、pH 6.3) で再懸濁後、遠心操作を繰り返し、上記 1 M シュークローズ溶液で 2 回洗浄した。沈殿物に 1 M ソルビトール溶液 (20 mM MES、pH 6.4) に 40 mM 塩化カルシウムを加えた溶液 500  $\mu$  l に懸濁し、プロトプラスト溶液とした。この溶液を 4 $^{\circ}$ C で保存した。

プロトプラスト濃度は血球計算盤を用いて、直接検鏡により求めた。すべての遠心操作はスウィングローターで 1,000 $\times$  g、5 分間、室温下で行った。

#### d. 形質転換

10<sup>6</sup> 個/100  $\mu$  l 濃度のプロトプラスト溶液 100  $\mu$  l に対して、実施例 12 で作製したプラスミド pGPCDH1 (2  $\mu$  g) を添加した。さらに選択マーカーとして、コリオラス・ヒルスタス由来のオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子を保持するプラスミド pUCR1 (特開平 6-054691 号公報; FERM BP-4201) を 0.2  $\mu$  g 添加し 30 分間氷冷した。次に、液量に対して等量の PEG 溶液 (50% PEG3400、20 mM MOPS (pH 6.4)) を加え、30 分間氷冷した。次に、0.5 M シュークローズおよびロイシンを含む最少寒天培地 (寒天 1%) に混合してプレートに撒いた。上記プレートを 28 $^{\circ}$ C で数日間培養を行い、形質転換体を得た。さらに形質転換体から DNA を調製し、目的とするセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子発現プラスミド pGPCDH1 が組み込まれていることをサザンハイブリダイゼーションにより確認した。

[実施例 23] セロビオースデヒドロゲナーゼを高分泌生産するコリオラス・ヒルスタス形質転換体の作製

前記実施例 2 2 で得られた形質転換株をグルコース・ペプトン培地（グルコース 30g/l、ポリペプトン 10g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5g/l、 $\text{MgSO}_4$  0.5g/l、塩酸チアミン 2mg/l、リン酸で pH4.5 に調製）を 100ml ずつ含む 300ml 容三角フラスコに植菌し、28℃、100rpm で震盪培養した。上記に示すセロビオースデヒドロゲナーゼ活性測定方法を用いて、セロビオースデヒドロゲナーゼ活性を経時的に測定した。コントロールでは 0.02U/ml であったが、形質転換体では 0.2U/ml であった。

〔実施例 2 4〕 セロビオースデヒドロゲナーゼ活性を抑制した形質転換体の選抜

前記実施例 2 2 に示した形質転換法の中で示したプラスミド p G P C D H 1 を実施例 1 3 で作製した p G P C D H A M に変えて形質転換を行った。得られた形質転換体は酸素漂白後広葉樹パルプ (LOKP) ・ペプトン培地（LOKP1%、ポリペプトン 0.5%、酵母エキス 0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15%、 $\text{MgSO}_4$  0.05%、リン酸で pH4.5 に調製）を 100ml ずつ含む 300ml 容三角フラスコに植菌し、28℃、100rpm で震盪培養した。上記したセロビオースデヒドロゲナーゼ活性測定方法を用いて、セロビオースデヒドロゲナーゼ活性を経時的に測定した。その結果、セロビオースデヒドロゲナーゼ活性を最大で 70%抑制された形質転換体を得ることができた。

〔実施例 2 5〕 セロビオースデヒドロゲナーゼを抑制した形質転換体を用いたチップ処理

実施例 2 4 により選抜したセロビオースデヒドロゲナーゼ活性を抑制した形質転換株をポテトデキストロース寒天培地上で 28℃にて培養した後、4℃で保存した。このプレートから直径 5mm のコルクボーラーで打ち抜いた切片を 5 つずつ、グルコース・ペプトン培地（グルコース 2%、ポリペプトン 0.5%、酵母エキス 0.2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$  0.05%、リン酸で pH4.5 に調製）を 100ml ずつ含む 300ml 容三角フラスコに植菌し、28℃、100rpm で 1 週間震盪培養した。培養後、菌体をろ別し、菌体に残存した培地を滅菌水で洗浄した。菌体は滅菌水と共に、ワーリングブレンダーで 15sec 粉碎し、絶乾重量 1kg のユーカリ材に対し、菌体の乾燥重量が 10mg になるように植菌した。植菌後は菌が全体に行き渡るようによく攪拌した。培養は 28℃で通気をしながら 1 週間静置培養を行った。チップ含水率が 40~65%になるように随時飽和水蒸気を通気させた。通気する際の通気量は対チップ当り、0.01vvm になるように行った。

〔実施例 2 6〕 セロビオースデヒドロゲナーゼ活性を抑制した形質転換体による機械パルプの製造

ラジアータパイン材を用い実施例 2 5 に準じてチップ処理を行った。処理後の木材チップをラボ用リファイナー（熊谷理機社製）を用いて叩解して、カナディアンスタンダードフリネスを 200ml とした後、パルプ物理用試験用手抄きシートの調製は Tappi 試験法 T205om-81 に準拠して、パルプ手抄きシートの物理試験は Tappi 法 T220 om-83 に準拠して行った。使用電力量はワットメーター（Hiokidenki model3133）と積分計（model3141）を用いた。チップ収率測定は水分を含んだ木材チップを容器に絶乾重量で 1 k g 分取し、処理前後のチップ絶乾重量を測定し、以下の式を用いてチップ収率を算出した。

$$(\text{処理後の絶乾重量}) / (\text{処理前の絶乾重量}) \times 100$$

表 3 に示すようにセロビオースデヒドロゲナーゼを抑制した形質転換株は収率減を抑制することができ、解繊エネルギーを削減できた。また、引裂き強さ、破裂強さ共に増加した。野生株で処理すると解繊エネルギーの削減効果は得られたものの、紙力は低下した。

表 3

セロビオースデヒドロゲナーゼ活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が機械パルプへ与える影響

|                               | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-------------------------------|---------|-------|------|
| チップ収率 (%)                     | 99.8    | 98.9  | 94.7 |
| 解繊エネルギー (Kw・h/ton)            | 2560    | 1792  | 1840 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 7.92    | 8.21  | 6.95 |
| 比破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 1.35    | 1.52  | 1.21 |

〔実施例 2 7〕 セロビオースデヒドロゲナーゼ活性を抑制した形質転換体により処理したチップの蒸解

実施例 2 5 に準じてユーカリ材のチップ処理を行った後、絶乾重量 400 g のチップを測りとりオートクレープ内で液比 5、硫化度 30%、有効アルカリ 17% (Na<sub>2</sub>O

として) となるように蒸解白液を加え、蒸解温度を 150℃にてクラフト蒸解を行った。クラフト蒸解終了後、黒液を分離し、得られたチップを高濃度離解機によって解繊後、濾布で遠心脱水と水洗浄を 3 回繰り返した。次いでスクリーンにより、未蒸解物を除き、遠心脱水し蒸解未漂白パルプを得た。

上記のクラフト蒸解して得られたパルプに対して、NaOH を 2.0 質量%添加し、酸素ガスを注入し、100℃、酸素ゲージ圧 0.49MPa(5kg/cm<sup>2</sup>) で 60 分間処理を行った。

上記で得たパルプを下記に示すように、D-E-P-D の 4 段漂白処理を行った。最初の二酸化塩素処理(D)は、パルプ濃度が 10 質量%となるように調製し、二酸化塩素を 0.4 質量%添加し、70℃、40 分間処理を行った。次いで、イオン交換水にて洗浄、脱水後、パルプ濃度を 10 質量%に調製し、苛性ソーダを 1 質量%添加し、70℃、90 分間のアルカリ抽出処理(E)を行った。次いで、イオン交換水にて洗浄、脱水後、パルプ濃度を 10 質量%に調製し、過酸化水素 0.5 質量%、苛性ソーダ 0.5 質量%を順次添加し、70℃、120 分間の過酸化水素処理(P)を行った。次いで、イオン交換水にて洗浄、脱水後、パルプ濃度を 10%に調製し、二酸化塩素 0.25 質量%を添加し、70℃、180 分間二酸化塩素処理(D)を行った。最後にイオン交換水にて洗浄、脱水後、JIS P 8123 に準じた白色度 86.0%の漂白パルプを得た。

上記で得たパルプ濃度が 4 質量%のパルプスラリーをリファイナーによりフリーネスが 410ml (CSF) となるように叩解した。

〔実施例 28〕K a 価の測定、パルプ物理用試験用手抄きシートの調製、パルプ手抄きシートの物理試験

銅価の測定は、JIS P 8211 に準じて行った。パルプ物理用試験用手抄きシートの調製は Tappi 試験法 T205-om81 に準拠して、パルプ手抄きシートの物理試験は Tappi 法 T220om-83 に準拠して行った。表 4 に示すように、形質転換体、野生株で木材チップを処理すると蒸解後の K a 価は減少し、精選収率は増加し、粕率は減少した。また、表 5 に示すように野生株と比較すると、形質転換体は紙力低下を引き起こさなかった。

表 4

セロビオースデヒドロゲナーゼ活性を抑制した微生物を用いたチップ処理が蒸解性に与える影響

|          | Control | 形質転換体 | 野性株  |
|----------|---------|-------|------|
| 蒸解後 Ka 価 | 20.1    | 17.6  | 17.7 |
| 精選収率(%)  | 45.7    | 47.8  | 47.3 |
| 粕率(%)    | 1.20    | 0.65  | 0.84 |

表 5

セロビオースデヒドロゲナーゼ活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が紙力強度に与える影響

白色度 86、CSF (カナディアンショッパーフリーネス) = 410 ml

|                               | Control | 形質転換体 | 野性株   |
|-------------------------------|---------|-------|-------|
| PFI (rev)                     | 2,600   | 2,200 | 2,200 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 9.4     | 9.3   | 8.5   |
| 裂断長 (km)                      | 8.62    | 8.71  | 7.34  |
| 非破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 6.76    | 7.72  | 7.54  |
| 耐折強さ (logT)                   | 2.31    | 2.35  | 2.19  |

注) Control は微生物処理を行わなかった木材チップ処理によりパルプシートを作製したもの

[実施例 29] セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体の選抜

前記実施例 22 に示した形質転換法の中で示したプラスミド pGPCDH1 を実施例 14 で作製した pGPCBHI26AM に変えて形質転換を行った。得られた形質転換体は実施例 24 と同様の方法で培養し、4-methyl-0-umbelliferyl-cellobioside を基質としたセロビオヒドロラーゼ I 活性測定方法を用いて、セロビオヒドロラーゼ I 活性を経時的に測定した。その結果、セロビオヒドロラーゼ I 活性を最大で 60% 抑制された形質転換体を得る



ことができた。

〔実施例 30〕 セロバイオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体を用いたチップ処理

実施例 29 により選抜したセロバイオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換株を用い実施例 25 と同様の方法によりユーカリ材に対しチップ処理を行った。

〔実施例 31〕 セロバイオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体による機械パルプの製造

ラジアータパイン材を用い実施例 25 に準じてチップ処理を行い、実施例 26 同様の試験を行った。表 6 に示すようにセロバイオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換株は収率減を抑制することができ、解繊エネルギーを削減できた。また、引裂き強さ、破裂強さ共に増加した。野生株で処理すると解繊エネルギーの削減効果は得られたものの、紙力は低下した。

表 6

セロバイオヒドロラーゼ I 活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が機械パルプへ与える影響

|                               | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-------------------------------|---------|-------|------|
| チップ収率 (%)                     | 99.8    | 98.7  | 94.7 |
| 解繊エネルギー (Kw・h/ton)            | 2560    | 1782  | 1840 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 7.92    | 8.02  | 6.95 |
| 比破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 1.35    | 1.50  | 1.21 |

〔実施例 32〕 セロバイオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体により処理したチップの蒸解

実施例 30 で処理したチップに対して実施例 27 と同様の方法にて蒸解を行った。

〔実施例 33〕 K a 価の測定、パルプ物理用試験用手抄きシートの調製、パルプ手抄きシートの物理試験

実施例 32 で得られたパルプを実施例 28 に準じてカップー価の測定等を行っ

た。表 7 に示すように、形質転換体、野生株で木材チップを処理すると蒸解後の  $K_a$  価は減少し、精選収率は増加し、粕率は減少した。また、表 8 に示すように野生株と比較すると、形質転換体は紙力低下を引き起こさなかった。

表 7

セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した微生物を用いたチップ処理が蒸解性に与える影響

|             | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-------------|---------|-------|------|
| 蒸解後 $K_a$ 価 | 20.1    | 17.7  | 17.7 |
| 精選収率(%)     | 45.7    | 47.9  | 47.3 |
| 粕率(%)       | 1.20    | 0.75  | 0.84 |

表 8

セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が紙力強度に与える影響

白色度 86、CSF (カナディアンショッパーフリーネス) = 410 ml

|                             | Control | 形質転換体 | 野生株   |
|-----------------------------|---------|-------|-------|
| PFI (rev)                   | 2,600   | 2,300 | 2,200 |
| 比引裂強さ ( $mN \cdot m^2/g$ )  | 9.4     | 9.4   | 8.5   |
| 裂断長 (km)                    | 8.62    | 8.51  | 7.34  |
| 非破裂強さ ( $kPa \cdot m^2/g$ ) | 6.76    | 7.82  | 7.54  |
| 耐折強さ (logT)                 | 2.31    | 2.34  | 2.19  |

注) Control は微生物処理を行わなかった木材チップ処理によりパルプシートを作製したもの

[実施例 34] セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体の選抜

前記実施例 22 に示した形質転換法の中で示したプラスミド pGPCDH1 を実施例 15 で作製した pGPCBHI27AM に変えて形質転換を行った。得ら

れた形質転換体は実施例 2 6 と同様の方法にて培養を行い、4-methyl-0-umbelliferyl-cellobioside を基質としたセロビオヒドロラーゼ I 活性測定方法を用いて、セロビオヒドロラーゼ I 活性を経時的に測定した。その結果、セロビオヒドロラーゼ I 活性を最大で 70 % 抑制された形質転換体を得ることができた。

〔実施例 3 5〕 セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体を用いたチップ処理

実施例 3 4 により選抜したセロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体を実施例 2 5 と同様の方法によりユーカリ材に対し、チップ処理を行った。

〔実施例 3 6〕 セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体による機械パルプの製造

実施例 3 4 で得られた形質転換体を用いてラジアータパイン材に対し実施例 2 5 に準じてチップ処理を行い、実施例 2 6 と同様の試験を行った。表 9 に示すようにセロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換株は収率減を抑制することができ、解繊エネルギーを削減できた。また、引裂き強さ、破裂強さ共に増加した。野生株で処理すると解繊エネルギーの削減効果は得られたものの、紙力は低下した。

表 9

セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が機械パルプへ与える影響

|                               | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-------------------------------|---------|-------|------|
| チップ収率 (%)                     | 99.8    | 98.5  | 94.7 |
| 解繊エネルギー (Kw・h/ton)            | 2560    | 1752  | 1840 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 7.92    | 8.11  | 6.95 |
| 比破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 1.35    | 1.42  | 1.21 |

〔実施例 3 7〕 セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体により処理したチップの蒸解

実施例 25 に準じてユーカリ材のチップ処理を行った後、実施例 27 と同様の方法にて処理チップの蒸解を行った。

〔実施例 38〕 K a 価の測定、パルプ物理用試験用手抄きシートの調製、パルプ手抄きシートの物理試験

実施例 37 で得られたパルプを実施例 28 に準じてカップー価の測定等を行った。表 10 に示すように、形質転換体、野生株で木材チップを処理すると蒸解後の K a 価は減少し、精選収率は増加し、粕率は減少した。また、表 11 に示すように野生株と比較すると、形質転換体は紙力低下を引き起こさなかった。

表 10

セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した微生物を用いたチップ処理が蒸解性に与える影響

|           | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-----------|---------|-------|------|
| 蒸解後 K a 価 | 20.1    | 17.5  | 17.7 |
| 精選収率 (%)  | 45.7    | 48.2  | 47.3 |
| 粕率 (%)    | 1.20    | 0.45  | 0.84 |

表 11

セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が紙力強度に与える影響

白色度 86、CSF (カナディアンショッパーフリーネス) = 410 ml

|                               | Control | 形質転換体 | 野生株   |
|-------------------------------|---------|-------|-------|
| PFI (rev)                     | 2,600   | 2,300 | 2,200 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 9.4     | 9.1   | 8.5   |
| 裂断長 (km)                      | 8.62    | 8.54  | 7.34  |
| 非破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 6.76    | 7.75  | 7.54  |
| 耐折強さ (logT)                   | 2.31    | 2.31  | 2.19  |

注) Control は微生物処理を行わなかった木材チップ処理によりパルプシ

ートを作製したもの

〔実施例 39〕 セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体の選抜

前記実施例 22 に示した形質転換法の中で示したプラスミド pGPCDH1 を実施例 16 で作製した pGPCBHI31AM に変えて形質転換を行った。得られた形質転換体は実施例 24 と同様の方法にて培養を行い、4-methyl-0-umbelliferyl-cellobioside を基質としたセロビオヒドロラーゼ I 活性測定方法を用いて、セロビオヒドロラーゼ I 活性を経時的に測定した。その結果、セロビオヒドロラーゼ I 活性を最大で 70% 抑制された形質転換体を得ることができた。

〔実施例 40〕 セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体を用いたチップ処理

実施例 39 により選抜したセロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換株を用い実施例 25 と同様の方法によりユーカリ材に対し、チップ処理を行った。

〔実施例 41〕 セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体による機械パルプの製造

実施例 39 で得られた形質転換体を用い、ラジアータパイン材に対し、実施例 25 に準じてチップ処理を行い、実施例 26 と同様の試験を行った。

表 12 に示すようにセロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換株は収率減を抑制することができ、解繊エネルギーを削減できた。また、引裂き強さ、破裂強さ共に増加した。野生株で処理すると解繊エネルギーの削減効果は得られたものの、紙力は低下した。

表 12

セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が機械パルプへ与える影響

|           | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-----------|---------|-------|------|
| チップ収率 (%) | 99.8    | 98.3  | 94.7 |

|                               |      |      |      |
|-------------------------------|------|------|------|
| 解繊エネルギー (Kw・h/ton)            | 2560 | 1820 | 1840 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 7.92 | 8.35 | 6.95 |
| 比破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 1.35 | 1.43 | 1.21 |

〔実施例 4 2〕 セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した形質転換体により処理したチップの蒸解

実施例 3 9 より得られたチップを実施例 2 7 と同様の方法にて処理チップの蒸解を行った。

〔実施例 4 3〕 K a 価の測定、パルプ物理用試験用手抄きシートの調製、パルプ手抄きシートの物理試験

実施例 4 2 より得られたパルプを実施例 2 8 に準じてカップー価の測定等を行った。表 1 3 に示すように、形質転換体、野生株で木材チップを処理すると蒸解後の K a 価は減少し、精選収率は増加し、粕率は減少した。また、表 1 4 に示すように野生株と比較すると、形質転換体は紙力低下を引き起こさなかった。

表 1 3

セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した微生物を用いたチップ処理が蒸解性に与える影響

|           | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-----------|---------|-------|------|
| 蒸解後 K a 価 | 20.1    | 17.8  | 17.7 |
| 精選収率 (%)  | 45.7    | 47.4  | 47.3 |
| 粕率 (%)    | 1.20    | 0.63  | 0.84 |

表 1 4

セロビオヒドロラーゼ I 活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が紙力強度に与える影響

白色度 86、CSF (カナディアンショッパーフリーネス) = 410 ml

|  | Control | 形質転換体 | 野生株 |
|--|---------|-------|-----|
|--|---------|-------|-----|

|                               |        |        |        |
|-------------------------------|--------|--------|--------|
| P F I ( r e v )               | 2, 600 | 2, 200 | 2, 200 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>3</sup> /g)  | 9. 4   | 9. 1   | 8. 5   |
| 裂断長 (k m)                     | 8. 62  | 8. 61  | 7. 34  |
| 非破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 6. 76  | 7. 73  | 7. 54  |
| 耐折強さ (logT)                   | 2. 31  | 2. 35  | 2. 19  |

注) C o n t r o l は微生物処理を行わなかった木材チップ処理によりパルプシートを作製したもの

#### [実施例 4 4] セロビオヒドロラーゼ II 活性を抑制した形質転換体の選抜

前記実施例 2 2 に示した形質転換法の中で示したプラスミド p G P C D H 1 を実施例 1 7 で作製した p G P C B H I I A M に変えて形質転換を行った。得られた形質転換体を実施例 2 3 と同様の培養を行い、培養菌体を経時的にサンプリングし、m R N A を回収し、セロビオヒドロラーゼ II 遺伝子の存在量を測定した。その結果、宿主細胞と比較してセロビオヒドロラーゼ II 活性が約 5 0 % 抑制されている形質転換体を得ることができた。

#### [実施例 4 5] セロビオヒドロラーゼ II 活性を抑制した形質転換体を用いたチップ処理

実施例 4 4 により選抜したセロビオヒドロラーゼ II 活性を抑制した形質転換株を実施例 2 5 記載の方法によりユーカリ材に対しチップ処理をした。

#### [実施例 4 6] セロビオヒドロラーゼ II 活性を抑制した形質転換体による機械パルプの製造

実施例 4 4 で得られた形質転換体を用いラジアータパイン材に対し、実施例 2 5 に準じてチップ処理を行った。処理後の木材チップを実施例 2 6 記載の方法により紙力などの検討を行った。表 1 5 に示すようにセロビオヒドロラーゼ II 活性を抑制した形質転換株は収率減を抑制することができ、解繊エネルギーを削減できた。また、引裂き強さ、破裂強さ共に増加した。野生株で処理すると解繊エネルギーの削減効果は得られたものの、紙力は低下した。

表 1 5

セロビオヒドロラーゼ II 活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が機械パ  
ルプへ与える影響

|                               | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-------------------------------|---------|-------|------|
| チップ収率 (%)                     | 99.8    | 98.1  | 94.7 |
| 解繊エネルギー (Kw・h/ton)            | 2560    | 1830  | 1840 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 7.92    | 8.25  | 6.95 |
| 比破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 1.35    | 1.44  | 1.21 |

〔実施例 47〕セロビオヒドロラーゼ II 活性を抑制した形質転換体により処理し  
たチップの蒸解

実施例 45 で得られたチップを、実施例 27 と同様の方法にて処理チップの蒸  
解を行った。

〔実施例 48〕K a 価の測定、パルプ物理用試験用手抄きシートの調製、パルプ  
手抄きシートの物理試験

実施例 47 で得られたパルプを、実施例 28 に準じてカップー価の測定等を行  
った。表 16 に示すように、形質転換体、野生株で木材チップを処理すると蒸解  
後の K a 価は減少し、精選収率は増加し、粕率は減少した。また、表 17 に示す  
ように野生株と比較すると、形質転換体は紙力低下を引き起こさなかった。

表 16

セロビオヒドロラーゼ II 活性を抑制した微生物を用いたチップ処理が蒸解性に与  
える影響

|           | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-----------|---------|-------|------|
| 蒸解後 K a 価 | 20.1    | 18.1  | 17.7 |
| 精選収率 (%)  | 45.7    | 47.1  | 47.3 |
| 粕率 (%)    | 1.20    | 0.86  | 0.84 |

表 17



セロビオヒドロラーゼⅡ活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が紙力強度に与える影響

白色度 86、CSF（カナディアンショッパフリーネス）＝410 ml

|                               | Control | 形質転換体 | 野性株   |
|-------------------------------|---------|-------|-------|
| PFI (rev)                     | 2,600   | 2,300 | 2,200 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 9.4     | 8.7   | 8.5   |
| 裂断長 (km)                      | 8.62    | 8.45  | 7.34  |
| 非破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 6.76    | 7.49  | 7.54  |
| 耐折強さ (logT)                   | 2.31    | 2.32  | 2.19  |

注) Control は微生物処理を行わなかった木材チップ処理によりパルプシートを作製したもの

〔実施例 49〕糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体の選抜

前記実施例 22 に示した形質転換法の中で示したプラスミド pGPCDH1 を実施例 18 で作製した pGPEG61AM に変えて形質転換を行った。得られた形質転換体を実施例 23 と同様の培養を行い培養液を経時的にサンプリングし、カルボキシメチルセルロース (CMC) 分解活性を測定した。その結果、宿主細胞と比較してエンドグルカナーゼ活性が約 50% 抑制されている形質転換体を得ることができた。

〔実施例 50〕糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体を用いたチップ処理

実施例 49 により選抜した糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換株を実施例 25 に記載の方法によりユーカリ材に対しチップ処理をした。

〔実施例 51〕糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体による機械パルプの製造

実施例 49 で得られた形質転換体をラジアータパイン材に対し、実施例 25 に準じてチップ処理を行った。処理後の木材チップを実施例 26 に記載の方法により

紙力などの検討を行った。表 18 に示すように糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換株は収率減を抑制することができ、解繊エネルギーを削減できた。また、引裂き強さ、破裂強さ共に増加した。野生株で処理すると解繊エネルギーの削減効果は得られたものの、紙力は低下した。

表 18

糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が機械パルプへ与える影響

|                               | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-------------------------------|---------|-------|------|
| チップ収率 (%)                     | 99.8    | 98.6  | 94.7 |
| 解繊エネルギー (Kw・h/ton)            | 2560    | 1800  | 1840 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 7.92    | 8.21  | 6.95 |
| 比破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 1.35    | 1.41  | 1.21 |

〔実施例 52〕 糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体により処理したチップの蒸解

実施例 50 で得られたチップを、実施例 27 記載の方法により処理チップの蒸解を行った。

〔実施例 53〕 K a 価の測定、パルプ物理用試験用手抄きシートの調製、パルプ手抄きシートの物理試験

実施例 52 で得られたパルプを、実施例 28 記載の方法に準じてカップパー価の測定などを行った。表 19 に示すように、形質転換体、野生株で木材チップを処理すると蒸解後の K a 価は減少し、精選収率は増加し、粕率は減少した。また、表 20 に示すように野生株と比較すると、形質転換体は紙力低下を引き起こさなかった。

表 19

糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した微生物を用いたチップ処理が蒸解性に与える影響

|          | Control | 形質転換体 | 野性株  |
|----------|---------|-------|------|
| 蒸解後 Ka 価 | 20.1    | 17.7  | 17.7 |
| 精選収率(%)  | 45.7    | 47.6  | 47.3 |
| 粕率(%)    | 1.20    | 0.73  | 0.84 |

表 20

糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が紙力強度に与える影響

白色度 86、CSF (カナディアンショッパーフリーネス) = 410 ml

|                               | Control | 形質転換体 | 野性株   |
|-------------------------------|---------|-------|-------|
| PFI (rev)                     | 2,600   | 2,200 | 2,200 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 9.4     | 9.5   | 8.5   |
| 裂断長 (km)                      | 8.62    | 8.63  | 7.34  |
| 非破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 6.76    | 7.63  | 7.54  |
| 耐折強さ (logT)                   | 2.31    | 2.33  | 2.19  |

注) Control は微生物処理を行わなかった木材チップ処理によりパルプシートを作製したもの

〔実施例 54〕糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体の選抜

前記実施例 22 に示した形質転換法の中で示したプラスミド pGP CDH1 を実施例 19 で作製した pGPEG12AM に変えて形質転換を行った。得られた形質転換体を実施例 23 と同様の培養を行い培養液を経時的にサンプリングし、カルボキシメチルセルロース (CMC) 分解活性を測定した。その結果、宿主細胞と比較してエンドグルカナーゼ活性が約 50% 抑制されている形質転換体を得ることができた。

〔実施例 55〕糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体を用いたチップ処理

実施例 5 4 により選抜した糖分解酵素ファミリー 1 2 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換株を実施例 2 5 に記載の方法によりユーカリ材に対しチップ処理をした。

〔実施例 5 6〕糖分解酵素ファミリー 1 2 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体による機械パルプの製造

実施例 5 4 で得られた形質転換体をラジアータパイン材に対し、実施例 2 5 に準じてチップ処理を行った。処理後の木材チップを実施例 2 6 に記載の方法により紙力などの検討を行った。表 2 1 に示すように糖分解酵素ファミリー 1 2 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換株は収率減を抑制することができ、解繊エネルギーを削減できた。また、引裂き強さ、破裂強さ共に増加した。野生株で処理すると解繊エネルギーの削減効果は得られたものの、紙力は低下した。

表 2 1

糖分解酵素ファミリー 1 2 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が機械パルプへ与える影響

|                               | Control | 形質転換体 | 野生株   |
|-------------------------------|---------|-------|-------|
| チップ収率 (%)                     | 99. 8   | 98. 5 | 94. 7 |
| 解繊エネルギー (Kw・h/ton)            | 2560    | 1860  | 1840  |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 7. 92   | 8. 06 | 6. 95 |
| 比破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 1. 35   | 1. 43 | 1. 21 |

〔実施例 5 7〕糖分解酵素ファミリー 1 2 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体により処理したチップの蒸解

実施例 5 5 で得られたチップを、実施例 2 7 に記載の方法により処理チップの蒸解を行った。

〔実施例 5 8〕K a 価の測定、パルプ物理用試験用手抄きシートの調製、パルプ手抄きシートの物理試験

実施例 5 6 で得られたパルプを、実施例 2 8 に記載の方法に準じてカップー価の測定などを行った。表 2 2 に示すように、形質転換体、野生株で木材チップを処

理すると蒸解後のK a 価は減少し、精選収率は増加し、粕率は減少した。また、表 2 3 に示すように野生株と比較すると、形質転換体は紙力低下を引き起こさなかった。

表 2 2

糖分解酵素ファミリー 1 2 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した微生物を用いたチップ処理が蒸解性に与える影響

|           | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-----------|---------|-------|------|
| 蒸解後 K a 価 | 20.1    | 18.2  | 17.7 |
| 精選収率(%)   | 45.7    | 47.1  | 47.3 |
| 粕率(%)     | 1.20    | 0.93  | 0.84 |

表 2 3

糖分解酵素ファミリー 1 2 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が紙力強度に与える影響

白色度 86、CSF (カナディアンショッパーフリーネス) = 410 ml

|                               | Control | 形質転換体 | 野生株   |
|-------------------------------|---------|-------|-------|
| PFI (rev)                     | 2,600   | 2,400 | 2,200 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 9.4     | 9.3   | 8.5   |
| 裂断長 (km)                      | 8.62    | 8.58  | 7.34  |
| 非破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 6.76    | 7.63  | 7.54  |
| 耐折強さ (logT)                   | 2.31    | 2.31  | 2.19  |

注) Control は微生物処理を行わなかった木材チップ処理によりパルプシートを作製したもの

[実施例 59] 糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体の選抜

前記実施例 2 2 に示した形質転換法の中で示したプラスミド pGPCDH1 を

実施例 20 で作製した p G P P C E G 5 A M に変えて形質転換を行った。得られた形質転換体を実施例 23 に記載の方法で培養を行い、培養液を経時的に回収し、カルボキシメチルセルロース (CMC) 分解活性を測定した。その結果、宿主細胞と比較してエンドグルカナーゼ活性が約 20 % 抑制されている形質転換体を得ることができた。

〔実施例 60〕 糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体を用いたチップ処理

実施例 59 により選抜した糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換株を実施例 25 記載の方法によりユーカリ材に対しチップ処理をした。

〔実施例 61〕 糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体による機械パルプの製造

実施例 59 で得られた形質転換体を用いてラジアータパイン材に対し実施例 25 に準じてチップ処理を行った。処理後の木材チップを実施例 26 記載の方法により紙力などの検討を行った。

表 24 に示すように糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換株は収率減を抑制することができ、解繊エネルギーを削減できた。また、引裂き強さ、破裂強さ共に増加した。野生株で処理すると解繊エネルギーの削減効果は得られたものの、紙力は低下した。

表 24

糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が機械パルプへ与える影響

|                               | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-------------------------------|---------|-------|------|
| チップ収率 (%)                     | 99.8    | 98.2  | 94.7 |
| 解繊エネルギー (Kw・h/ton)            | 2560    | 1910  | 1840 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 7.92    | 8.05  | 6.95 |
| 比破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 1.35    | 1.34  | 1.21 |

〔実施例 6 2〕糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体により処理したチップの蒸解

実施例 6 0 で得られたチップを実施例 2 7 記載の方法により処理チップの蒸解を行った。

〔実施例 6 3〕K a 価の測定、パルプ物理用試験用手抄きシートの調製、パルプ手抄きシートの物理試験

実施例 6 2 で得られたパルプを実施例 2 8 に準じてカップー価などの測定を行った。表 2 5 に示すように、形質転換体、野生株で木材チップを処理すると蒸解後の K a 価は減少し、精選収率は増加し、粕率は減少した。また、表 2 6 に示すように野生株と比較すると、形質転換体は紙力低下を引き起こさなかった。

表 2 5

糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した微生物を用いたチップ処理が蒸解性に与える影響

|           | Control | 形質転換体 | 野生株   |
|-----------|---------|-------|-------|
| 蒸解後 K a 価 | 20. 1   | 17. 9 | 17. 7 |
| 精選収率 (%)  | 45. 7   | 46. 8 | 47. 3 |
| 粕率 (%)    | 1. 20   | 0. 95 | 0. 84 |

表 2 6

糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が紙力強度に与える影響

白色度 8 6、CSF (カナディアンショッパーフリーネス) = 4 1 0 m l

|                               | Control | 形質転換体  | 野生株    |
|-------------------------------|---------|--------|--------|
| P F I ( r e v )               | 2, 600  | 2, 300 | 2, 200 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 9. 4    | 9. 4   | 8. 5   |
| 裂断長 (k m)                     | 8. 62   | 8. 55  | 7. 34  |
| 非破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 6. 76   | 7. 36  | 7. 54  |

|             |      |      |      |
|-------------|------|------|------|
| 耐折強さ (logT) | 2.31 | 2.26 | 2.19 |
|-------------|------|------|------|

注) C o n t r o l は微生物処理を行わなかった木材チップ処理によりパルプシートを作製したもの

〔実施例 6 4〕糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体の選抜

前記実施例 2 2 に示した形質転換法の中で示したプラスミド p G P C D H 1 を実施例 2 1 で作製した p G P P C E G 9 A M に変えて形質転換を行った。得られた形質転換体を実施例 2 3 記載の方法により培養し、培養液を経時的に回収し、カルボキシメチルセルロース (CMC) 分解活性を測定した。その結果、宿主細胞と比較してエンドグルカナーゼ活性が約 3 0 % 抑制されている形質転換体を得ることができた。

〔実施例 6 5〕糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体を用いたチップ処理

実施例 6 4 により選抜した糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換株を実施例 2 5 記載の方法によりユーカリ材に対しチップ処理をした。

〔実施例 6 6〕糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体による機械パルプの製造

実施例 6 4 で得られた形質転換体を用いラジアータパイン材に対し実施例 2 5 に準じてチップ処理を行った。処理後の木材チップを実施例 2 6 記載の方法により紙力などの検討を行った。

表 2 7 に示すように糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換株は収率減を抑制することができ、解繊エネルギーを削減できた。また、引裂き強さ、破裂強さ共に増加した。野生株で処理すると解繊エネルギーの削減効果は得られたものの、紙力は低下した。

表 2 7

糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した微生物を用



## いた木材チップ処理が機械パルプへ与える影響

|                               | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-------------------------------|---------|-------|------|
| チップ収率 (%)                     | 99.8    | 98.1  | 94.7 |
| 解繊エネルギー (Kw・h/ton)            | 2560    | 1860  | 1840 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 7.92    | 7.98  | 6.95 |
| 比破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 1.35    | 1.36  | 1.21 |

〔実施例 6 7〕 糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した形質転換体により処理したチップの蒸解

実施例 6 5 で得られたチップを、実施例 2 7 と同様の方法にて処理チップの蒸解を行った。

〔実施例 6 8〕 K a 価の測定、パルプ物理用試験用手抄きシートの調製、パルプ手抄きシートの物理試験

実施例 6 7 で得られたパルプを、実施例 2 8 記載の方法に準じてカップー価などの測定を行った。表 2 8 に示すように、形質転換体、野生株で木材チップを処理すると蒸解後の K a 価は減少し、精選収率は増加し、粕率は減少した。また、表 2 9 に示すように野生株と比較すると、形質転換体は紙力低下を引き起こさなかった。

表 2 8

糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した微生物を用いたチップ処理が蒸解性に与える影響

|           | Control | 形質転換体 | 野生株  |
|-----------|---------|-------|------|
| 蒸解後 K a 価 | 20.1    | 18.1  | 17.7 |
| 精選収率 (%)  | 45.7    | 46.7  | 47.3 |
| 粕率 (%)    | 1.20    | 0.86  | 0.84 |

表 2 9

糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ活性を抑制した微生物を用いた木材チップ処理が紙力強度に与える影響

白色度 86、CSF（カナディアンショッパーフリーネス）= 410 ml

|                               | Control | 形質転換体 | 野性株   |
|-------------------------------|---------|-------|-------|
| PFI (rev)                     | 2,600   | 2,200 | 2,200 |
| 比引裂強さ (mN・m <sup>2</sup> /g)  | 9.4     | 9.6   | 8.5   |
| 裂断長 (km)                      | 8.62    | 8.44  | 7.34  |
| 非破裂強さ (kPa・m <sup>2</sup> /g) | 6.76    | 7.45  | 7.54  |
| 耐折強さ (logT)                   | 2.31    | 2.25  | 2.19  |

注) Control は微生物処理を行わなかった木材チップ処理によりパルプシートを作製したもの

#### [実施例 69] セロビオースデヒドロゲナーゼ活性

##### 1. 測定法の概要

セロビオースデヒドロゲナーゼ活性の測定は次のように行った。0.67mM ジクロロフェノールインドフェノール（シグマ社製）、3.33mM セロビオース（関東化学株式会社製）、pH 5、250mM の酢酸緩衝液をそれぞれ 250ul、100ul、100ul を混合した溶液に被検液 50ul を添加し、37℃にて反応させた。反応開始後、ジクロロフェノールインドフェノールの極大吸収波長 550nm（モル吸光係数 3965L/mol/cm）における吸光度（光路長 1cm）を連続的に測定した。セロビオースデヒドロゲナーゼの活性単位については上記の条件で 1 分間に 1umol のジクロロフェノールインドフェノールを減少させる酵素量を 1 unit（ユニット：U）とした。

##### 2. 粗酵素液の調製（1）

酸素漂白後広葉樹クラフトパルプ（カップー価 8.5、白色度 46.0%）1.0%、ペプトン 1.0%、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.005%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15%、チアミン塩酸塩 20ppb を含む液体培地（pH5.0）100ml を 500ml 容三角フラスコに採り、紙栓をした後、121℃で 15 分間蒸気滅菌した。これにコリオラス・ヒルスタス IFO 4917 株を白金耳植菌し、27℃で回転振盪培養した（振幅 25mm、120 往復／分）。培養終了後、遠心

分離 (10,000rpm×10 分) して培養上清を分離し、セロビオースデヒドロゲナーゼの粗酵素液を得た。上記の条件で活性を測定した結果、培養上清中のセロビオースデヒドロゲナーゼ活性は、培養開始後 72 時間後で 0.06 U/ml であった。

### 3. 粗酵素液の調製 (2)

アビセル(フナコシ薬品株式会社製)1.0%、ペプトン1.0%、0.005%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15%、チアミン塩酸塩 20ppb を含む液体培地 (pH5.0) 100ml を 500ml 容三角フラスコに採り、紙栓をした後、121℃で 15 分間蒸気滅菌した。これにコリオラス・ヒルスタス IF04917 株を白金耳植菌し、27℃で回転振盪培養した (振幅 25mm、120 往復/分)。培養終了後、遠心分離 (10,000rpm×10 分) して培養上清を分離し、セロビオースデヒドロゲナーゼの粗酵素液を得た。上記の条件で活性を測定した結果、培養上清中のセロビオースデヒドロゲナーゼ活性は、培養開始後 72 時間後で 0.07 U/ml であった。

### 4. セロビオースデヒドロゲナーゼの精製 (1)

実施例 1 又は実施例 2 で得た粗酵素液を硫酸分画し、80%沈殿画分を遠心分離 (20,000rpm×10 分) にて回収した後、20mM リン酸緩衝液 (pH6.0) に溶解した。得られた粗酵素液について、1 M 硫酸を含む 20mM リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化した Resource 15PHE (直径 1.6×3cm、Amasham 社製) を用いて疎水クロマトグラフィーを行った。

吸着画分を硫酸濃度 1 M～0 M までの濃度勾配で 20mM リン酸緩衝液 (pH6.0) にて溶出し、9ml ずつ分画し、活性画分を得た。この画分をさらに 100mM 塩化ナトリウムを含む 20mM リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化した HiLoad26/60 Superdex200 (直径 2.6×60cm、Amasham 社製) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。流速 1.5ml/min で行い、3ml ずつ分画し活性画分を得た。

この画分を集め、20mM リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化した POROS HQ (直径 4.6×10cm、ABI 社製) を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。吸着画分を 0 M～1M までの濃度勾配で塩化ナトリウムを含む該緩衝液にて溶出し、9ml ずつ分画し活性画分を得た。

活性画分に対し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ、均一に精製されていることが確認できた。培養液に対する精製酵素の収率は 4.9%、比活性

は 10.5U/mg であった。

#### 5. セロビオースデヒドロゲナーゼの精製 (2)

実施例 1 又は実施例 2 で得た粗酵素液を凍結・融解を行うことにより析出するグルカン状物質を遠心分離 (20,000rpm×10 分) で除去した後、硫酸濃度が 1M になるように硫酸を添加した。得られた粗酵素液について、1M 硫酸を含む 20mM リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化した Resource 15PHE (直径 1.6×3cm、Amasham 社製) を用いて疎水クロマトグラフィーを行った。

吸着画分を硫酸濃度 1M～0M までの濃度勾配で 20mM リン酸緩衝液 (pH6.0) にて溶出し、9ml ずつ分画し、活性画分を得た。この画分をさらに 100mM 塩化ナトリウムを含む 20mM リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化した HiLoad26/60 Superdex200 (直径 2.6×60cm、Amasham 社製) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。流速 1.5ml/min で行い、3ml ずつ分画し活性画分を得た。この画分を集め、20mM リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化した monoQ HR 5/5 (直径 0.5×5cm、Amasyam 社製) を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。吸着画分を 0M～0.4M までの濃度勾配で塩化ナトリウムを含む該緩衝液にて溶出し、1ml ずつ分画し活性画分を得た。

活性画分に対し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ、均一に精製されていることが確認できた。培養液に対する精製酵素の収率は 16.6%、比活性は 10.5U/mg であった。

#### 産業上の利用性

本発明は、担子菌由来のセルロース分解酵素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子及び該遺伝子のアンチセンス遺伝子を含む組換えベクターで形質転換された形質転換体及びその用途を提供するものであり、該セルロース分解酵素をコードする遺伝子のアンチセンス遺伝子を用いた遺伝子組換えによるセルロース分解酵素活性抑制宿主細胞を木材チップ処理に用いることによって、収率や紙力に優れたパルプ製造法を実施することが可能となるものである。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本

明細書にとり入れるものとする。

## 請 求 の 範 囲

1. 担子菌由来のセルロース分解酵素遺伝子の転写産物の全部又はその一部に対して実質的に相補的なアンチセンスRNAをコードするDNAを調製する工程と、

(a) 前記DNA、又は

(b) 前記DNAとプロモーター活性を有するDNA断片とを含み、該DNAが、転写によりセルロース分解酵素遺伝子のアンチセンスRNAが生成するように該DNA断片に結合されている、組換えDNA、を含むベクターを作製する工程と、

該ベクターを用いた形質転換を行い、セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞を調製する工程と、

該セルロース分解酵素活性抑制宿主細胞を木材チップに接種して処理する工程とを含む、木材チップの処理方法。

2. セルロース分解酵素遺伝子が、セロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子、セロビオヒドロラーゼ I、セロビオヒドロラーゼ II、糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子、糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子、糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子、及び糖分解酵素ファミリー 9 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子からなる群から選択される 1 種以上である、請求項 1 に記載の方法。

3. セロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子が、以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む単離されたセロビオースデヒドロゲナーゼ遺伝子である、請求項 2 に記載の方法。

(a) 配列番号 1 又は 3 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセロビオースデヒドロゲナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 1 又は 3 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつセロビオースデヒドロゲナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

4. セロビオヒドロラーゼ I 遺伝子が、以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む単離されたセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子である、請求項 2 に記載の方法。

(a) 配列番号 7、9 又は 11 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 7、9 又は 11 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつセロビオヒドロラーゼ I 遺伝子酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

5. セロビオヒドロラーゼ II 遺伝子が、以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む単離されたセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子である、請求項 2 に記載の方法。

(a) 配列番号 14 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 14 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつセロビオヒドロラーゼ II 遺伝子酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

6. 糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子が、以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む単離された糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子である、請求項 2 に記載の方法。

(a) 配列番号 18 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 18 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ糖分解酵素ファミリー 61 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

7. 糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子が、以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む単離された糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子である、請求項 2 に記載の方法。

(a) 配列番号 20 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ糖素分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 20 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ糖分解酵素ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

8. 糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子が、以下の (a) ~ (c) のいずれかの塩基配列を含む単離された糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ遺伝子である、請求項 2 に記載の方法。

(a) 配列番号 24 で表される塩基配列。

(b) (a) の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号 24 において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ糖分解酵素ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。



9. 糖分解酵素ファミリー9に属するエンドグルカナーゼ遺伝子が、以下の(a)～(c)のいずれかの塩基配列を含む単離された糖分解酵素ファミリー9に属するエンドグルカナーゼ遺伝子である、請求項2に記載の方法。

(a) 配列番号28で表される塩基配列。

(b) (a)の塩基配列と相補的な塩基配列を有する塩基配列とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつ糖分解酵素ファミリー9に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

(c) 配列番号28において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ糖分解酵素ファミリー9に属するエンドグルカナーゼ酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

10. 担子菌が、コリオラス・ヒルスタス (*Coriolus hirsutus*) 又はファネロケエテ・クリソスポリウム (*Phanerochaete chrysosporium*) である、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

11. 宿主細胞がコリオラス・ヒルスタスである、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

12. 請求項1～11のいずれか1項に記載の方法によって得られる木材チップ。

13. 請求項12に記載の木材チップを用いたパルプの製造法。

14. 請求項13に記載の方法によって得られるパルプ。

図 1

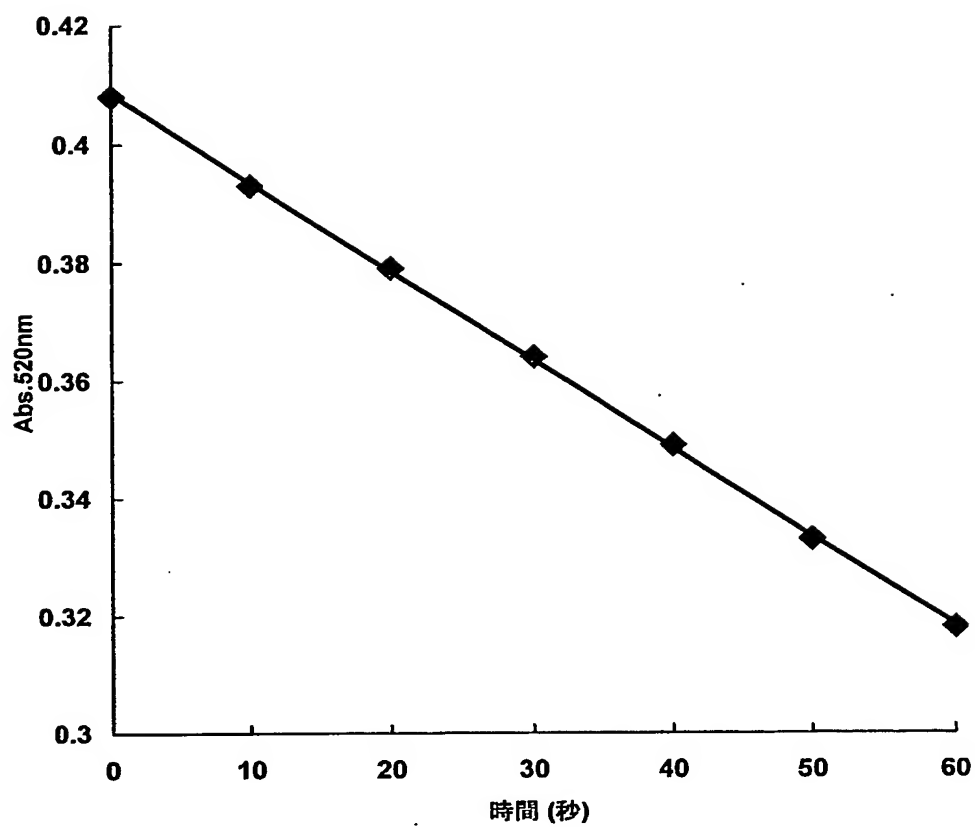


図 2

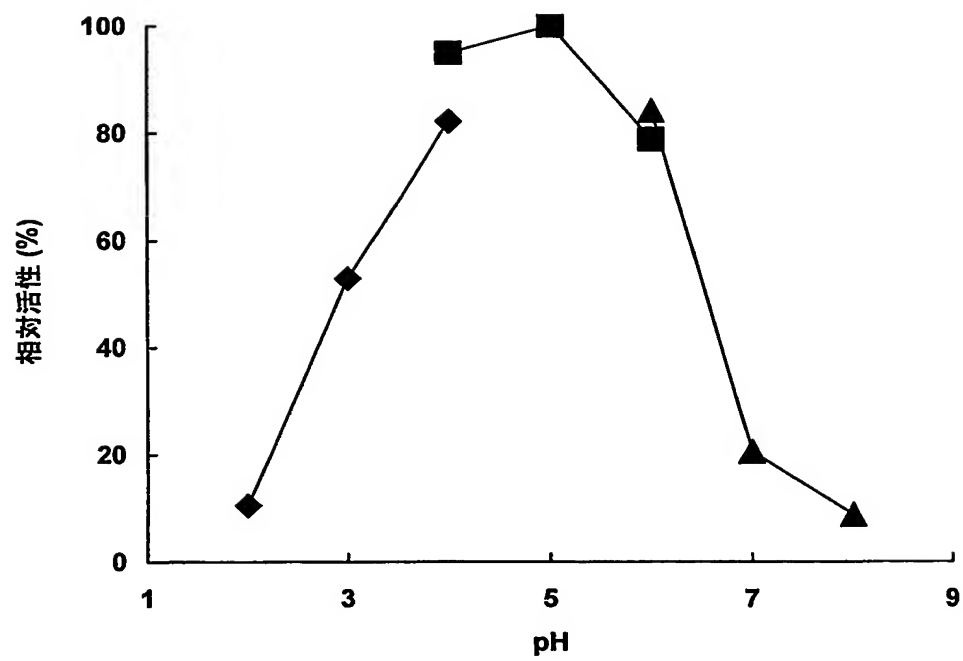


図 3

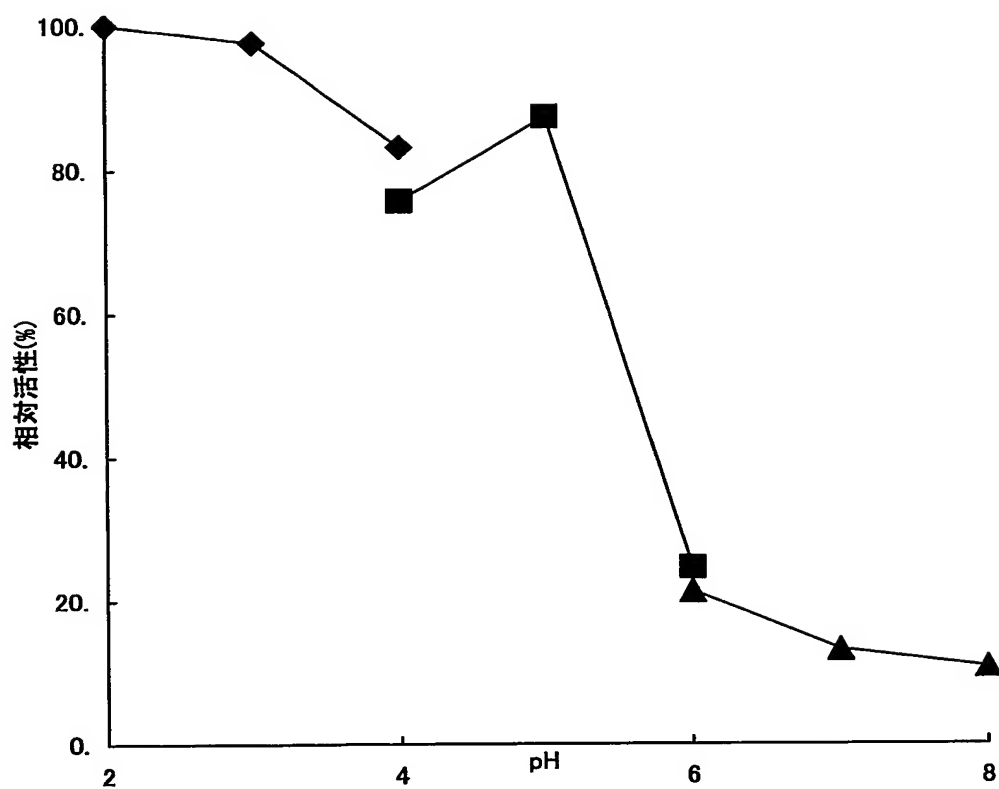


图 4

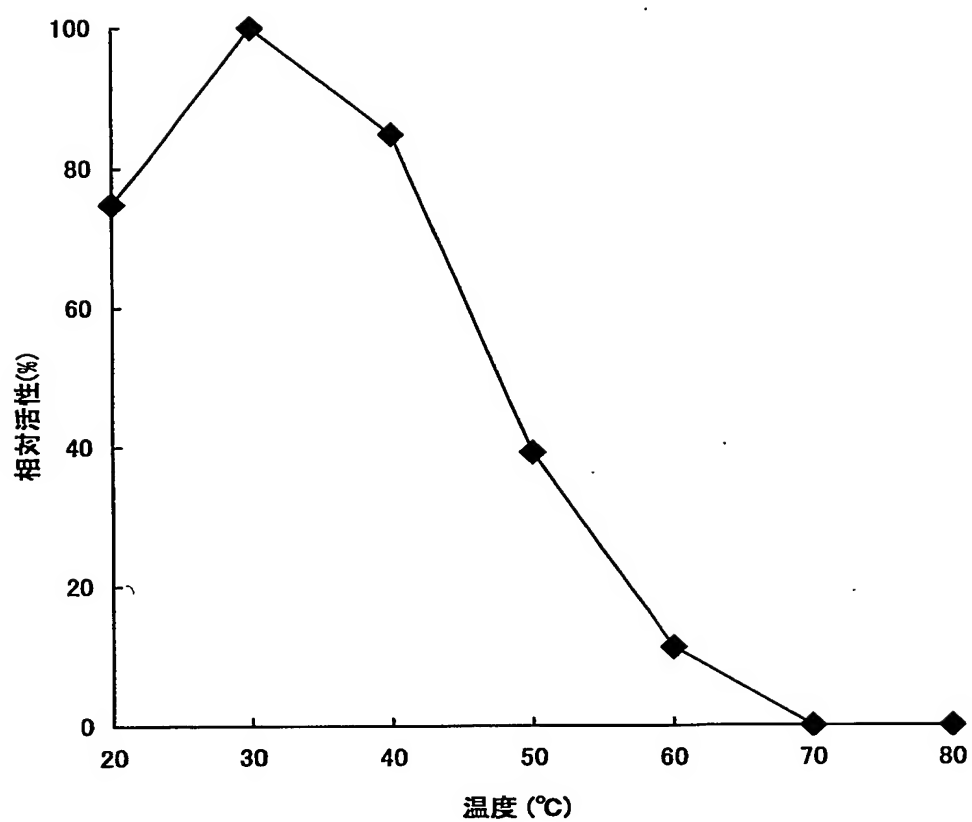
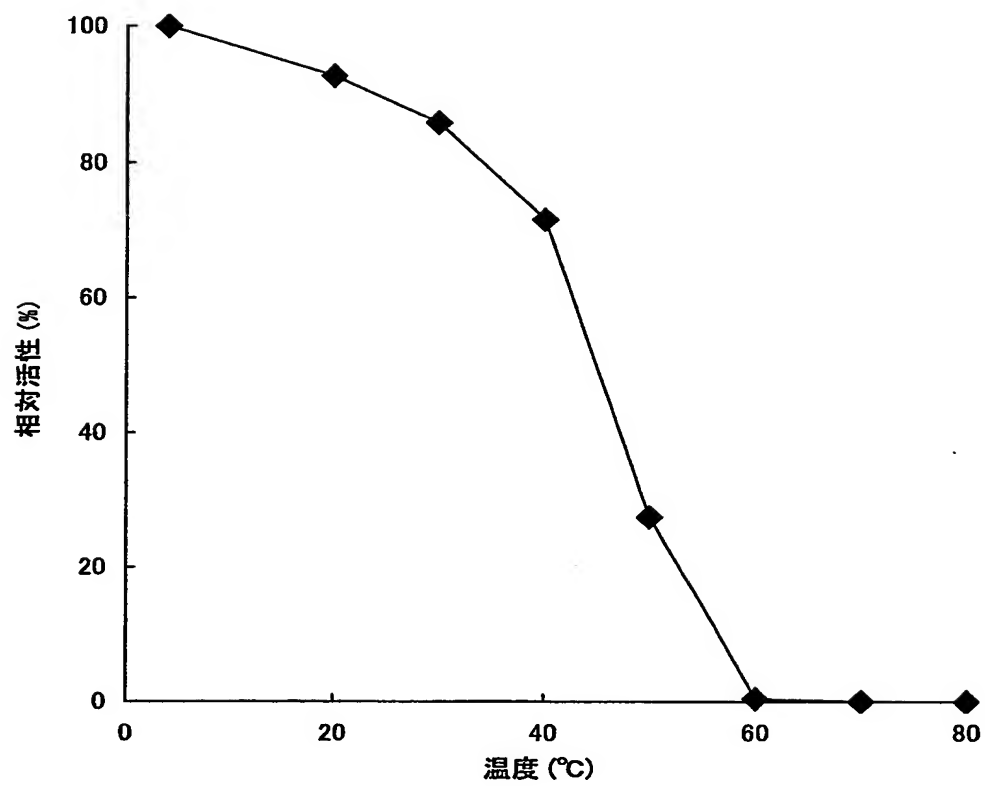


図 5



## SEQUENCE LISTING

<110> OJI PAPER CO., LTD.

<120> Cellulolytic enzyme and use thereof

<130> PH-1724-PCT

<160> 52

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 3420

<212> DNA

<213> Coriolus hirsutus

<220>

<223> Inventor: Akira, Tsukamoto ; Seiji, Nakagame ; Mari, Kabuto ;  
Jun Sugiura ; Hisako Sakaguchi ; Atsushi Furujo

<400> 1

catgtcctgt cggctccttg aatgctcggg tctttctcgc gataccgaag tgctgggcaa 60  
cccgggggacg cgtataaagt ccaaaaaatc ggtctttgac ggtgagcgcg aactacgac 120  
tgcccgccat gaagttcaag agtctcctgt tgtccgtgtt gccgttggtc ggctctggta 180  
tgttgcgggc ttccatccga caccgagacg agacgtgac agtaacacgc caccaccagt 240  
ctactcccag gtcgccgcac cctaccagga cgccggcaac ggcttcgtct ttgacgggtgt 300  
cactgatcca gtgcatagcg tcacgtatgg aatcgctctc cctcaggcgg cctccagctc 360

ggagttcatt ggcgagatcg tcgcgccaaa cgacgcacaa tggatcggtt tggctcttgg 420  
aggagccatg atcggcgacc tgcttctcgt cgcatggcca tatgagaaca aaattatttt 480  
ctccccctgc tacgcgacgt gagtatatgc tgttacatgt atgcagacgc tacgggctaa 540  
atacgccaat ctacacagcg gtacacgctg ccggcggtct acgaaggccc aaccattacc 600  
acactcccgt ccagttcgat caactcgacg cactggaagt tcgtgttccg ctgccagaac 660  
tgcacatgtg cgtacctcac attacgtatg acgtctccaa ctaaacctct tcacagcctg 720  
ggatggcgga agcattgacc cctccggcac tggcgtcttc gcgtgggcgt actcgaacgt 780  
cgcagtagat acccccgccg atcccaacag cagcttcgcc gagcacaccg actgtaagcg 840  
atcatctctg aaccatggta ctgaatcact catggtatat cgcagtcggc ttcttcggcg 900  
tcaacttccc cgatgctcag aactcgaact accaaagcta cctccagggc aacgccggca 960  
ctccccctcc cacatccgtc cctagcggcc cttccagcac tacgactact actggtccta 1020  
cggcaaccgt gagggcttcc acttcgctgt gcaggacgtt gctaacggtc tgtacaggct 1080  
acgccgtttg actacatcgt cgttgggtgcc ggcccagggt gtctcatcgc tgccgatcgc 1140  
ttgtcggagg cgggcaagaa ggtccttctt cttgagcgtg gtggaccttc gactgcagag 1200  
accggcggca cttacgatgt cccatgggcc aagtccgcta acgtgagttg aatacccttg 1260  
aatcgataat gcgcacaccg actgactccc atccatggta gctcacaaaa ttcgatgtcc 1320  
cgggattgtt cgagacgctg ttcaccgaca cgaaccatt ctggtgggtgc aagggtgggt 1380  
cggtttcttg aagcgcattg caacgtcgt aagaaagcct tctagacacc aacttctttg 1440  
ctggatgcat tctcgggtggc ggtaccacgg tcaacggagc gtaagtgcatt tgactctgcc 1500  
gtgcccagc agccctcctg acgacaatct acagtcttta ctggtacccc aacaacaatg 1560  
acttctccac cgccagcggg tggccgagca gctggacca ccaccagccg ttcaccaaca 1620  
agctgaagca gcgtctgcc agcacagacc acccctccac cgacggccag cgctacctcg 1680  
aacagtccgc gaacgtcgtc cagcagctgc tccagagcca gggctaccgg caggtcacga 1740  
tcaacgacga cccggactcc aaggaccacg tcttcggcta cagcgcgttt gacttctca 1800  
acgggcagcg cgccggtccc gtcgcgacgt acttcagac cgcgctcgcg cgcaagaact 1860  
tcgtgtaccg cgacaacgtg ctgctcacgc aggtcatccg caacggctcg acgatcacgg 1920  
gcgtgcgcac gaacgacctc accatcgggc ccgacggcat cgtgcccctc aaccggaacg 1980  
gccgcgtcat ccttgctggc ggctcgttcg ggaccccgcg catcctgttc caaagcggca 2040  
tcgggccgac ggacatgctc caggctcgtc agggcaacgc gcaggccgcg gcgaacctgc 2100



ccccgcagaa ccagtggatc aacctcccgg tcggccaggc cgtgtctgac aacccgctga 2160  
tcaacgtgag tgacgctgca tacgcgttca agcccgcgg cctgaggctg acatggctcg 2220  
tagttggctt tcactcacc gagcatcgac gcgtacgaca actgggcgac cgtatggctg 2280  
aacccaaggc aggcggacgc tcagcagtac ctgcagagcc gctccggcgt gttggcgggc 2340  
gcgtccccga agtacgttcg acatcgcgcc tggagtcttg cagggtgtctg accagtcctc 2400  
tctacaggct gaacttctgg agggcctacg gcggcagtga cggtatcacc cgctacgtat 2460  
gtctatgttc gtcttgatct ccggtgctac gacctgacat tggccgtagg cgcaaggaa 2520  
tgtccgtcct ggcgagcat ccgtgaacac ctccgttgcg tacaacgga gccagatctt 2580  
cacgatcacc ctctacctgt gggtaccagc ccgaccgtat gtggactgtg cagctaaccg 2640  
tgcaccacta cagggtccaac ggtatccagt cgcgcggtcg catcggcgtg gacgccgcc 2700  
tgaacgcgaa ggcgctcgtc aaccctggc tcaccaacgc cgtcgacaag acgatcctgc 2760  
tgcaggccct gcacgacgtc gtctccacac tgaataacgg taaggccact tctccgtacc 2820  
tgcccgcg cgcgccgctc atgcctctcc ttctccagt ccaaggcctg acgatgatca 2880  
ccccgacca caccatgacg atcgagcagt acgtcgacgc ctacgaccg gtgagtcccg 2940  
ccgcagcat ccggcgaaa taaaaaacgg acgtcgacgc cccgtccca cgcaggcgac 3000  
gatgtgctcc aaccactggg tgggcggcgc gaagatcggc acaagcccgt ccacggccgt 3060  
cgtcgacgag aacgcgaagg tgttcaacac ggacaacctg gtacgtttcc ctgccctttt 3120  
tcttcccgtg ccctccgctg acgcggcctt cctgcagttc atcgtcgatg cgtccatcat 3180  
cccgtctctg ccggtcggga acccgaggc cctgctcatg tctgcggccg agcaggccgt 3240  
gtcgaagatc ctcgcgctcg ccggaggacc gtgaggcagg gggttcaaaa gcatttggag 3300  
cgctgctatg gtagaccatg aagcgggatg ggtcctgtcg atatgagaca cgatgtatat 3360  
attatatatt ctgcacgggt ttcttcttcc tggaagcctg atgaggctct cgacgtgcca 3420

<210> 2

<211> 768

<212> PRT

<213> *Coriolus hirsutus*

&lt;400&gt; 2

Met Lys Phe Lys Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu Pro Leu Val Gly Ser  
1 5 10 15

Val Tyr Ser Gln Val Ala Ala Pro Tyr Gln Asp Ala Gly Asn Gly Phe  
20 25 30

Val Phe Asp Gly Val Thr Asp Pro Val His Ser Val Thr Tyr Gly Ile  
35 40 45

Val Leu Pro Gln Ala Ala Ser Ser Ser Glu Phe Ile Gly Glu Ile Val  
50 55 60

Ala Pro Asn Asp Ala Gln Trp Ile Gly Leu Ala Leu Gly Gly Ala Met  
65 70 75 80

Ile Gly Asp Leu Leu Leu Val Ala Trp Pro Tyr Glu Asn Lys Ile Ile  
85 90 95

Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Thr Gly Tyr Thr Leu Pro Ala Val Tyr Glu  
100 105 110

Gly Pro Thr Ile Thr Thr Leu Pro Ser Ser Ser Ile Asn Ser Thr His  
115 120 125

Trp Lys Phe Val Phe Arg Cys Gln Asn Cys Thr Ser Trp Asp Gly Gly  
130 135 140

Ser Ile Asp Pro Ser Gly Thr Gly Val Phe Ala Trp Ala Tyr Ser Asn

145                      150                      155                      160

Val Ala Val Asp Thr Pro Ala Asp Pro Asn Ser Ser Phe Ala Glu His  
                         165                      170                      175

Thr Asp Phe Gly Phe Phe Gly Val Asn Phe Pro Asp Ala Gln Asn Ser  
                         180                      185                      190

Asn Tyr Gln Ser Tyr Leu Gln Gly Asn Ala Gly Thr Pro Pro Pro Thr  
                         195                      200                      205

Ser Val Pro Ser Gly Pro Ser Ser Thr Thr Thr Thr Thr Gly Pro Thr  
                         210                      215                      220

Ala Thr Ala Thr Pro Phe Asp Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Pro Gly  
225                      230                      235                      240

Gly Leu Ile Ala Ala Asp Arg Leu Ser Glu Ala Gly Lys Lys Val Leu  
                         245                      250                      255

Leu Leu Glu Arg Gly Gly Pro Ser Thr Ala Glu Thr Gly Gly Thr Tyr  
                         260                      265                      270

Asp Val Pro Trp Ala Lys Ser Ala Asn Leu Thr Lys Phe Asp Val Pro  
                         275                      280                      285

Gly Leu Phe Glu Thr Leu Phe Thr Asp Thr Asn Pro Phe Trp Trp Cys  
                         290                      295                      300

Lys Asp Thr Asn Phe Phe Ala Gly Cys Ile Leu Gly Gly Gly Thr Thr  
305 310 315 320

Val Asn Gly Ala Leu Tyr Trp Tyr Pro Asn Asn Asn Asp Phe Ser Thr  
325 330 335

Ala Ser Gly Trp Pro Ser Ser Trp Thr Asn His Gln Pro Phe Thr Asn  
340 345 350

Lys Leu Lys Gln Arg Leu Pro Ser Thr Asp His Pro Ser Thr Asp Gly  
355 360 365

Gln Arg Tyr Leu Glu Gln Ser Ala Asn Val Val Gln Gln Leu Leu Gln  
370 375 380

Ser Gln Gly Tyr Arg Gln Val Thr Ile Asn Asp Asp Pro Asp Ser Lys  
385 390 395 400

Asp His Val Phe Gly Tyr Ser Ala Phe Asp Phe Leu Asn Gly Gln Arg  
405 410 415

Ala Gly Pro Val Ala Thr Tyr Phe Gln Thr Ala Leu Ala Arg Lys Asn  
420 425 430

Phe Val Tyr Arg Asp Asn Val Leu Val Thr Gln Val Ile Arg Asn Gly  
435 440 445

Ser Thr Ile Thr Gly Val Arg Thr Asn Asp Leu Thr Ile Gly Pro Asp  
450 455 460

Gly Ile Val Pro Leu Asn Pro Asn Gly Arg Val Ile Leu Ala Gly Gly  
465 470 475 480

Ser Phe Gly Thr Pro Arg Ile Leu Phe Gln Ser Gly Ile Gly Pro Thr  
485 490 495

Asp Met Leu Gln Val Val Gln Gly Asn Ala Gln Ala Ala Ala Asn Leu  
500 505 510

Pro Pro Gln Asn Gln Trp Ile Asn Leu Pro Val Gly Gln Ala Val Ser  
515 520 525

Asp Asn Pro Ser Ile Asn Leu Val Phe Thr His Pro Ser Ile Asp Ala  
530 535 540

Tyr Asp Asn Trp Ala Thr Val Trp Ser Asn Pro Arg Gln Ala Asp Ala  
545 550 555 560

Gln Gln Tyr Leu Gln Ser Arg Ser Gly Val Leu Ala Gly Ala Ser Pro  
565 570 575

Lys Leu Asn Phe Trp Arg Ala Tyr Gly Gly Ser Asp Gly Ile Thr Arg  
580 585 590

Tyr Ala Gln Gly Thr Val Arg Pro Gly Ala Ala Ser Val Asn Thr Ser  
595 600 605

Val Ala Tyr Asn Ala Ser Gln Ile Phe Thr Ile Thr Leu Tyr Leu Ser

610

615

620

Asn Gly Ile Gln Ser Arg Gly Arg Ile Gly Val Asp Ala Ala Leu Asn

625

630

635

640

Ala Lys Ala Leu Val Asn Pro Trp Leu Thr Asn Ala Val Asp Lys Thr

645

650

655

Ile Leu Leu Gln Ala Leu His Asp Val Val Ser Thr Leu Asn Asn Val

660

665

670

Gln Gly Leu Thr Met Ile Thr Pro Asp His Thr Met Thr Ile Glu Gln

675

680

685

Tyr Val Asp Ala Tyr Asp Pro Ala Thr Met Cys Ser Asn His Trp Val

690

695

700

Gly Ala Ala Lys Ile Gly Thr Ser Pro Ser Thr Ala Val Val Asp Glu

705

710

715

720

Asn Ala Lys Val Phe Asn Thr Asp Asn Leu Phe Ile Val Asp Ala Ser

725

730

735

Ile Ile Pro Ser Leu Pro Val Gly Asn Pro Gln Gly Leu Leu Met Ser

740

745

750

Ala Ala Glu Gln Ala Val Ser Lys Ile Leu Ala Leu Ala Gly Gly Pro

755

760

765

<210> 3

<211> 3480

<212> DNA

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 3

```
agcgcacgcg gcgcgtacca aatgagcggt catgtcctgt cggctccttg aatgctcggg 60
tctttctcgc ggtaccgaag tgctgggcaa cccggggacg cgtataaagt ccaaaaaaatg 120
ggtcttgaac ggtgagcacg aactacgac cgcccgccat gaagctcaag agcctcctgt 180
tgtccgtggt gccgttggtc ggctctggta tgttgcagcc ttctatctga catcgagacg 240
agacgctgac agtaacgcac cacgaacagt ctacccccag gtcgccgcac cctaccagga 300
cgccggcaac ggcttcgtct ttgacggtgt cactgaccca gtgcatagcg tcacctatgg 360
aatcgtcctc cctcaggcgg cctccagctc ggagttcatt ggcgagatcg tcgcgcaaaa 420
cgacgcacaa tggatcggtt tggctcttgg aggagccatg atcggcgacc tgcttctcgt 480
cgcatggcca tatgagaaca aaatcatttt ctcccctcgc tacgcgacgt gagtatatgc 540
tgttacatgc atgcagacgc tcggggctaa atacgccaat attacagcgg gtacaccctg 600
ccggcggtct acgacggccc aaccattacc aactcccgt ccagttcggg caactcgacg 660
cactggaagt tcgtgtttcg ctgccagaac tgcacatgtg cgtacctcac atttcgtacg 720
acgtctccaa ctaaacctct tcacagcctg ggatggcgga agcattgacc cctccggcac 780
tggcgtcttc gcgtgggcgt actcgaacgt cgcagttgat accccgcgcg atcccaacag 840
cagcttcgcc gagcacaccg actgtaagca atcatctctt aatcccgggt ccgaatcact 900
catggtatat cgcagtcggc ttcttcggcg tcaacttccc cgatgctcag aactcgaact 960
acaaaaacta cctccagggc aacgccggca cccccctcc cacgtccgtc cctagcggcc 1020
cttccagcac tacgactact actggtccta cggcaactgt gagcgcttcc acttactgt 1080
gcagaacgtc gctaactttc tgtataggct acgccgtttg actacatcgt cgttggtgcc 1140
ggcccaggtg gtctcatcgc tgccgatcgc ctgtcggagg cgggcaagaa ggttcttctt 1200
cttgagcgtg gtggaccttc gacagcagag accggcggca cttacgatgc cccatgggcc 1260
aagtccgcta acgtgagttg aatacccttg aatcgataat gcgcacaccg actgactccc 1320
```

atccatggtgta gctcacaaaa ttcatgtgcc cgggattggtt cgagacgctg ttcaccgaca 1380  
cgaacccatt ctggtggtgc aagggtgggt cggtttctgg aagcgcatgt caacgtcgct 1440  
gagaaagcgt tctagatacc aacttctttg ctggatgcat tctcgggtggc ggtaccacgg 1500  
tcaacgggagc gtaagtgcac cgactctgcc gtgtccaagc agtcctccta acgacaatct 1560  
acagtcttta ctggtacccc aacaacaatg acttctccac ggccagcgga tggccgagca 1620  
gctgggcca ccaccagccg ttcaccagca agctgaagca gcgtctgccg agcacagacc 1680  
accctccac cgacggccag cgctacctcg aacagtccgc gaacgtcgtc cagcagctgc 1740  
ttcaaagcca gggctaccgg caggtcacga tcaacgacga cccggactcc aaggaccacg 1800  
tcttcggcta cagcgcgttc gacttctca acgggcagcg cgccggcccc gttgcgacgt 1860  
acttcagac cgcgctcgcg cgcaagaact tcgtgtaccg cgacaacgtg ctggtcacgc 1920  
aggtcatccg caacggctcg acgatcaccg gcgtgcgcac gaacgacctc accatcgggc 1980  
ccgacggcat cgtgccccctc aaccggaacg gccgcgtcat cctcgctggc ggctcggtcg 2040  
ggaccccgcg catctgttc caaagcggca tcggggccgac ggacatgctc caggtcgtgc 2100  
agggcaacgc gcaggctcg gcgaacctgc cccgcgagag ccagtggatc gacctccgg 2160  
tcggccaggc cgtgtctgac aaccgctga tcaacgtgag tgacgctgta tacgtgctct 2220  
agcccgccgg cctgaggctg acatggctcg tagttggtct tcacgcaccc gagcatcgac 2280  
gcgtacgaca actgggccac cgtgtggtcg aacccaggc aggcggacgc tcagcagtat 2340  
ctgcagagcc gctccggcgt gttggcgggc gcgtcccaa agtacgttcg acatcgtgtc 2400  
cggagtcttg caggtgtctg accagtcctc tctacaggct gaacttctgg agggcctacg 2460  
gcggcagtga cggcatcacc cgctacgtat gtctatgtcc gtcttcatca atggaaccgc 2520  
gatctgacat tatccgtagg cgcaaggaa cgtccgtcct ggccgagcat ccgtgaacac 2580  
ctccgttgcg tacaacgca gccagatctt cagcatcacc ctctacctgt gggtaccaac 2640  
ccggtcgtat gtataccgtg cagctgaccg tgcgccacca caggtccaac ggtatccagt 2700  
cgcgcggtcg cattggtgtg gacgccgccc tgaacgcgaa ggcgctcgtc aaccctggc 2760  
tcaccaacgc cgtcgacaag acgatcctgc tgcaggccct gcacgacgtc gtctccacac 2820  
tgaacaacgg taaggccgcc cctacatgcc cgctgcgcg cgccgctcat gccgtcctt 2880  
cctccagtcc aaggcctgac gatgatcacc cccgaccaca ccatgacgat cgagcagtac 2940  
gtcgacgcct acgaccgggt gagtcccgtc cgcagcatcc ccgcaaaaga aaaaaacga 3000  
acgtgacgc ccccgctcca cgcaggcgac gatgtgtctc aaccactggg tgggcgcgcg 3060



gaagatcggc acgagcccgt ccacggccgt cgtcgacgag aacgcgaagg tgttcaacac 3120  
ggacaacctg gtgcgttccc cttcgttatg taactcacca cctcccctgg ccaccgccgc 3180  
tgacaggatc gacgtttctg catcgcagtt catcgtcgac gcgtccatca tcccgtctct 3240  
gccggtcggg aaccgcgagg gggtgctcat gtccgcggcc gagcaggccg tgtcgaagat 3300  
cctcgcgctc gccggaggac cgtgagggag ggggttcaaa agcctttgga gcgctgctat 3360  
ggtggaccct gaagcgggat gggttctgtc gatatgagac acgatgtaat attatattct 3420  
gcatgaattt cttcttcctg cagcctaatt cggaactgtct ctcgatgtgc taacgagagc 3480

<210> 4

<211> 768

<212> PRT

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 4

Met Lys Leu Lys Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu Pro Leu Val Gly Ser  
1 5 10 15

Val Tyr Pro Gln Val Ala Ala Pro Tyr Gln Asp Ala Gly Asn Gly Phe  
20 25 30

Val Phe Asp Gly Val Thr Asp Pro Val His Ser Val Thr Tyr Gly Ile  
35 40 45

Val Leu Pro Gln Ala Ala Ser Ser Ser Glu Phe Ile Gly Glu Ile Val  
50 55 60

Ala Pro Asn Asp Ala Gln Trp Ile Gly Leu Ala Leu Gly Gly Ala Met  
65 70 75 80

Ile Gly Asp Leu Leu Leu Val Ala Trp Pro Tyr Glu Asn Lys Ile Ile  
85 90 95

Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Thr Gly Tyr Thr Leu Pro Ala Val Tyr Asp  
100 105 110

Gly Pro Thr Ile Thr Thr Leu Pro Ser Ser Ser Val Asn Ser Thr His  
115 120 125

Trp Lys Phe Val Phe Arg Cys Gln Asn Cys Thr Ser Trp Asp Gly Gly  
130 135 140

Ser Ile Asp Pro Ser Gly Thr Gly Val Phe Ala Trp Ala Tyr Ser Asn  
145 150 155 160

Val Ala Val Asp Thr Pro Ala Asp Pro Asn Ser Ser Phe Ala Glu His  
165 170 175

Thr Asp Phe Gly Phe Phe Gly Val Asn Phe Pro Asp Ala Gln Asn Ser  
180 185 190

Asn Tyr Gln Asn Tyr Leu Gln Gly Asn Ala Gly Thr Pro Pro Pro Thr  
195 200 205

Ser Val Pro Ser Gly Pro Ser Ser Thr Thr Thr Thr Thr Gly Pro Thr  
210 215 220

Ala Thr Ala Thr Pro Phe Asp Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Pro Gly  
12/62

225                      230                      235                      240

Gly Leu Ile Ala Ala Asp Arg Leu Ser Glu Ala Gly Lys Lys Val Leu

                    245                      250                      255

Leu Leu Glu Arg Gly Gly Pro Ser Thr Ala Glu Thr Gly Gly Thr Tyr

                    260                      265                      270

Asp Ala Pro Trp Ala Lys Ser Ala Asn Leu Thr Lys Phe Asp Val Pro

                    275                      280                      285

Gly Leu Phe Glu Thr Leu Phe Thr Asp Thr Asn Pro Phe Trp Trp Cys

                    290                      295                      300

Lys Asp Thr Asn Phe Phe Ala Gly Cys Ile Leu Gly Gly Gly Thr Thr

305                      310                      315                      320

Val Asn Gly Ala Leu Tyr Trp Tyr Pro Asn Asn Asn Asp Phe Ser Thr

                    325                      330                      335

Ala Ser Gly Trp Pro Ser Ser Trp Ala Asn His Gln Pro Phe Thr Ser

                    340                      345                      350

Lys Leu Lys Gln Arg Leu Pro Ser Thr Asp His Pro Ser Thr Asp Gly

                    355                      360                      365

Gln Arg Tyr Leu Glu Gln Ser Ala Asn Val Val Gln Gln Leu Leu Gln

                    370                      375                      380

Ser Gln Gly Tyr Arg Gln Val Thr Ile Asn Asp Asp Pro Asp Ser Lys  
385 390 395 400

Asp His Val Phe Gly Tyr Ser Ala Phe Asp Phe Leu Asn Gly Gln Arg  
405 410 415

Ala Gly Pro Val Ala Thr Tyr Phe Gln Thr Ala Leu Ala Arg Lys Asn  
420 425 430

Phe Val Tyr Arg Asp Asn Val Leu Val Thr Gln Val Ile Arg Asn Gly  
435 440 445

Ser Thr Ile Thr Gly Val Arg Thr Asn Asp Leu Thr Ile Gly Pro Asp  
450 455 460

Gly Ile Val Pro Leu Asn Pro Asn Gly Arg Val Ile Leu Ala Gly Gly  
465 470 475 480

Ser Phe Gly Thr Pro Arg Ile Leu Phe Gln Ser Gly Ile Gly Pro Thr  
485 490 495

Asp Met Leu Gln Val Val Gln Gly Asn Ala Gln Ala Ala Ala Asn Leu  
500 505 510

Pro Pro Gln Ser Gln Trp Ile Asp Leu Pro Val Gly Gln Ala Val Ser  
515 520 525

Asp Asn Pro Ser Ile Asn Leu Val Phe Thr His Pro Ser Ile Asp Ala  
530 535 540

Tyr Asp Asn Trp Ala Thr Val Trp Ser Asn Pro Arg Gln Ala Asp Ala  
545 550 555 560

Gln Gln Tyr Leu Gln Ser Arg Ser Gly Val Leu Ala Gly Ala Ser Pro  
565 570 575

Lys Leu Asn Phe Trp Arg Ala Tyr Gly Gly Ser Asp Gly Ile Thr Arg  
580 585 590

Tyr Ala Gln Gly Thr Val Arg Pro Gly Ala Ala Ser Val Asn Thr Ser  
595 600 605

Val Ala Tyr Asn Ala Ser Gln Ile Phe Thr Ile Thr Leu Tyr Leu Ser  
610 615 620

Asn Gly Ile Gln Ser Arg Gly Arg Ile Gly Val Asp Ala Ala Leu Asn  
625 630 635 640

Ala Lys Ala Leu Val Asn Pro Trp Leu Thr Asn Ala Val Asp Lys Thr  
645 650 655

Ile Leu Leu Gln Ala Leu His Asp Val Val Ser Thr Leu Asn Asn Val  
660 665 670

Gln Gly Leu Thr Met Ile Thr Pro Asp His Thr Met Thr Ile Glu Gln  
675 680 685

Tyr Val Asp Ala Tyr Asp Pro Ala Thr Met Cys Ser Asn His Trp Val

690

695

700

Gly Ala Ala Lys Ile Gly Thr Ser Pro Ser Thr Ala Val Val Asp Glu  
705 710 715 720

Asn Ala Lys Val Phe Asn Thr Asp Asn Leu Phe Ile Val Asp Ala Ser  
725 730 735

Ile Ile Pro Ser Leu Pro Val Gly Asn Pro Gln Gly Leu Leu Met Ser  
740 745 750

Ala Ala Glu Gln Ala Val Ser Lys Ile Leu Ala Leu Ala Gly Gly Pro  
755 760 765

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 5

taygaraaya avatthttn

19

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

gayatcaagt tyatcratgg

20

<210> 7

<211> 1496

<212> DNA

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 7

atgttcccca cagtctccct cctcgcgttc tccctccttg cgaccgtcta cggtcagcaa 60  
gtcggcaccc tgacggcgga gaaccacccc cgcctcaccg tccagcagtg cacggccaag 120  
aacaactgcc agaccagca gcaactccgtc gtgctcgact ccaactggcg ctggctccac 180  
gccaccaccg gcagcaacaa ctgctacacc ggcaacacct gggatgcgtt gctctgcccc 240  
gatgcgacca cctgcgccaa gaactgcgcg gtcgacggcg ccgactatgc cggatatgtc 300  
cgttcttgcg gctgcgctgc ctgcgacgcg ccagttgtct aacacacgcg ctcgctaggc 360  
acctacggca tcaccacgaa cggcaacgcg ctcacgtca agttcgtgca gcagggcccg 420  
tactcgaaga acatcggctc gcgcgtgtac ctcatggacg cgcaggacca gaagtacgag 480  
ctcttcaacc tgaagaacca ggagttcacg ttcgacgtcg acatgtcgaa cctcccctgc 540  
ggcctcaacg gcgcgtctta cttcgtcgag atggacgccg acggcggcgc gtcccgttc 600  
ccgaccaaca aggccggcgc gaagtacgga accggctact gcgacacca gtgcccgcag 660  
gacatcaagt tcatcaacgg cgtggtaagc accgacctcc ccgctgcccc actccccgct 720  
gcgtgctcac atccgccccg caggccaacc tcgaggggtg ggccgggctcg ccctctgacc 780

cgaactcggg caccggcagc ttcggcacgt gctgcaacga gatggacgtg tgggaggcga 840  
 acaagaacgg cgccgcgttc acgccgcacg tctgctccgt cacgagccag acgcgctgcg 900  
 agggcacgca gtgcggcgac ggcgacgagc gctacgacgg cctctgcgac aaggacggct 960  
 gcgacttcaa ctcggttcgc aagggcgacc agaccttctt cgggccgggc aagaccgtcg 1020  
 acacgaacgc gaagttcacg gtcgtcacgc agttcctgac gaacaacaac cagacgtccg 1080  
 gccagctgtc cgagatccgc cgcctgtacg tgcagaacgg gcgggtgacg gcgaactcga 1140  
 agacgaacgt gcccgggctc ggcgcccttcg actcgatcac ggaccagttc tgcaacgcgc 1200  
 agaagcagggt gttcggcgac gacaacacgt tcgagaagct cgggtgggctc aacacgatgg 1260  
 gccaggcctt ccagcgcggc atggcgctcg tcatgtccat ctgggacgac cacgccgcgg 1320  
 gcatgctctg gctcgacgcc gactacccca ccgacgcgcc cgcgaccaac cccggtgtct 1380  
 cccgtggccc gtgctcggcc acctctggcg accccgcgac gatcgagaac agcgaggcga 1440  
 gctcgctcgt caccttctcg aacatcaagg tcggcccat cggctcgacg ttctga 1496

<210> 8

<211> 456

<212> PRT

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 8

Met Phe Pro Thr Val Ser Leu Leu Ala Phe Ser Leu Leu Ala Thr Val

1

5

10

15

Tyr Gly Gln Gln Val Gly Thr Leu Thr Ala Glu Asn His Pro Arg Leu

20

25

30

Thr Val Gln Gln Cys Thr Ala Lys Asn Asn Cys Gln Thr Gln Gln His

35

40

45



Ser Val Val Leu Asp Ser Asn Trp Arg Trp Leu His Ala Thr Thr Gly  
50 55 60

Ser Asn Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Ala Leu Leu Cys Pro  
65 70 75 80

Asp Ala Thr Thr Cys Ala Lys Asn Cys Ala Val Asp Gly Ala Asp Tyr  
85 90 95

Ala Gly Thr Tyr Gly Ile Thr Thr Asn Gly Asn Ala Leu Thr Leu Lys  
100 105 110

Phe Val Gln Gln Gly Pro Tyr Ser Lys Asn Ile Gly Ser Arg Val Tyr  
115 120 125

Leu Met Asp Ala Gln Asp Gln Lys Tyr Glu Leu Phe Asn Leu Lys Asn  
130 135 140

Gln Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Met Ser Asn Leu Pro Cys Gly Leu  
145 150 155 160

Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Glu Met Asp Ala Asp Gly Gly Ala Ser  
165 170 175

Arg Phe Pro Thr Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys  
180 185 190

Asp Thr Gln Cys Pro Gln Asp Ile Lys Phe Ile Asn Gly Val Ala Asn  
195 200 205

Leu Glu Gly Trp Ala Gly Ser Pro Ser Asp Pro Asn Ser Gly Thr Gly  
210 215 220

Ser Phe Gly Thr Cys Cys Asn Glu Met Asp Val Trp Glu Ala Asn Lys  
225 230 235 240

Asn Gly Ala Ala Phe Thr Pro His Val Cys Ser Val Thr Ser Gln Thr  
245 250 255

Arg Cys Glu Gly Thr Gln Cys Gly Asp Gly Asp Glu Arg Tyr Asp Gly  
260 265 270

Leu Cys Asp Lys Asp Gly Cys Asp Phe Asn Ser Phe Arg Xaa Gly Asp  
275 280 285

Gln Thr Phe Leu Gly Pro Gly Lys Thr Val Asp Thr Asn Ala Lys Phe  
290 295 300

Thr Val Val Thr Gln Phe Leu Thr Asn Asn Asn Gln Thr Ser Gly Gln  
305 310 315 320

Leu Ser Glu Ile Arg Arg Leu Tyr Val Gln Asn Gly Arg Val Ile Ala  
325 330 335

Asn Ser Lys Thr Asn Val Pro Gly Leu Gly Ala Phe Asp Ser Ile Thr  
340 345 350

Asp Gln Phe Cys Asn Ala Gln Lys Gln Val Phe Gly Asp Asp Asn Thr

355

360

365

Phe Glu Lys Leu Gly Gly Leu Asn Thr Met Gly Gln Ala Phe Gln Arg

370

375

380

Gly Met Ala Leu Val Met Ser Ile Trp Asp Asp His Ala Ala Gly Met

385

390

395

400

Leu Trp Leu Asp Ala Asp Tyr Pro Pro Thr Arg Pro Arg Pro Thr Pro

405

410

415

Val Val Ser Arg Gly Pro Cys Ser Ala Thr Ser Gly Asp Pro Ala Thr

420

425

430

Ile Glu Asn Ser Glu Ala Ser Ser Ser Val Thr Phe Ser Asn Ile Lys

435

440

445

Val Gly Pro Ile Gly Ser Thr Phe

450

455

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1488

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Coriolus hirsutus

&lt;400&gt; 9

atgttccccg cagtcgcct cctcgctctc tccttcttcg ccatcgccta cggccagcag 60

gtcggcacac tcacggcgga gaaccaccg aagatcacgg tccagcagt caccgggaag 120

aacagctgcc agaccctgca gcgctcggtc gtgctcgact ccaactggcg ctggctccac 180  
tcgaccagcg gcagcaacaa ctgctacacc ggcaacacct gggacagctc cctctgcccc 240  
gaccccacca cctgcgcgaa gaactgcgcg cttgacggcg ccgactatgc tggtagctt 300  
actcgtcctt tgggtctgac gggcgagcgt gctaaccata tttgatgcgt taggcaccta 360  
cggcatcacc acgagcggta accagctcag tctcaagttc gtaacgcacg gccagtactc 420  
gaccaacatc ggctcgcgcg tgtacctcct cgacggtagc gactccaagt accagcagtt 480  
caacctgaag aaccaggagt tcacgttcga catcgacatg tcgaagctcc cgtgcggcct 540  
caacggcgcg ctctacttcg tcgagatgga cgccgacggt ggtctctccc gcttcccctc 600  
caacaaggct ggcgcgaaagt acggcaccgg ctactgcgat acccagtgcc cgcacgacat 660  
caagttcatc aacggcgagg tgagttttca atgagtcaat cttcgtgtgt gccggtgctc 720  
acacgtccct tacaggccaa cgtcctcggc tggacgcct cagacagcga cccgaacgcg 780  
ggcagcggcc agtacggcac gtgctgcaac gagatggaca tctgggaggc gaactcgatg 840  
ggcgcgggcg taactccgca cgtctgctcc gtcacgagcc agacgcgctg ctcgggcacg 900  
gactgcggcg acggcgacaa ccgctacaac ggcatctgcg acaaggacgg ctgcgacttc 960  
aactcgtggc gcatgggcca ccagacgttc ctcgggcccg gcaagaccgt caacacgaac 1020  
cagaagttca cggtcgtgac gcagttcctg acgaacaaca accagacgtc gggcacgctc 1080  
tccgagatcc gccgcctgta cgtgcagaac gggaaggatga tcgcgaactc gaagacgaag 1140  
atccccggca tggacgcgta cgactcgatc accgacgcgt tctgcaacgc gcagaagcag 1200  
gcgttcggcg acaacaactc gttcgagagg ctcggcgggc tcaaggcgat gggcgccgcc 1260  
ttcgacaagg gcatgagcct cgtcatgtcc atctgggacg accacgaggc gaagatgctc 1320  
tggctcgaca gcgagtacc cctcgacaag gacgcttcca cgcccgggtgt ctctcgcggc 1380  
ccctgcgcgc ggacctccgg cgagccgaag gacgtcgagt ccaacagccc cgacgcgacc 1440  
gtcgtcttct ccaacatcaa gtacggcccc atcggtcga cctactaa 1488

<210> 10

<211> 456

<212> PRT

<213> *Coriolus hirsutus*

&lt;400&gt; 10

Met Phe Pro Ala Val Ala Leu Leu Ala Leu Ser Phe Phe Ala Ile Ala

1 5 10 15

Tyr Gly Gln Gln Val Gly Thr Leu Thr Ala Glu Asn His Pro Lys Ile

20 25 30

Thr Val Gln Gln Cys Thr Gly Lys Asn Ser Cys Gln Thr Leu Gln Arg

35 40 45

Ser Val Val Leu Asp Ser Asn Trp Arg Trp Leu His Ser Thr Ser Gly

50 55 60

Ser Asn Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Ser Ser Leu Cys Pro

65 70 75 80

Asp Pro Thr Thr Cys Ala Lys Asn Cys Ala Leu Asp Gly Ala Asp Tyr

85 90 95

Ala Gly Thr Tyr Gly Ile Thr Thr Ser Gly Asn Gln Leu Ser Leu Lys

100 105 110

Phe Val Thr His Gly Gln Tyr Ser Thr Asn Ile Gly Ser Arg Val Tyr

115 120 125

Leu Leu Asp Gly Ser Asp Ser Lys Tyr Gln Gln Phe Asn Leu Lys Asn

130 135 140

Gln Glu Phe Thr Phe Asp Ile Asp Met Ser Lys Leu Pro Cys Gly Leu  
145 150 155 160

Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Glu Met Asp Ala Asp Gly Gly Leu Ser  
165 170 175

Arg Phe Pro Ser Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys  
180 185 190

Asp Thr Gln Cys Pro His Asp Ile Lys Phe Ile Asn Gly Glu Ala Asn  
195 200 205

Val Leu Gly Trp Thr Pro Ser Asp Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ser Gly  
210 215 220

Gln Tyr Gly Thr Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser  
225 230 235 240

Met Gly Ala Ala Val Thr Pro His Val Cys Ser Val Thr Ser Gln Thr  
245 250 255

Arg Cys Ser Gly Thr Asp Cys Gly Asp Gly Asp Asn Arg Tyr Asn Gly  
260 265 270

Ile Cys Asp Lys Asp Gly Cys Asp Phe Asn Ser Trp Arg Met Gly Asp  
275 280 285

Gln Thr Phe Leu Gly Pro Gly Lys Thr Val Asn Thr Asn Gln Lys Phe  
290 295 300

Thr Val Val Thr Gln Phe Leu Thr Asn Asn Asn Gln Thr Ser Gly Thr  
305 310 315 320

Leu Ser Glu Ile Arg Arg Leu Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Ala  
325 330 335

Asn Ser Lys Thr Lys Ile Pro Gly Met Asp Ala Tyr Asp Ser Ile Thr  
340 345 350

Asp Ala Phe Cys Asn Ala Gln Lys Gln Ala Phe Gly Asp Asn Asn Ser  
355 360 365

Phe Glu Arg Leu Gly Gly Leu Lys Ala Met Gly Ala Ala Phe Asp Lys  
370 375 380

Gly Met Ser Leu Val Met Ser Ile Trp Asp Asp His Glu Ala Lys Met  
385 390 395 400

Leu Trp Leu Asp Ser Glu Tyr Pro Leu Asp Lys Asp Ala Ser Thr Pro  
405 410 415

Gly Val Ser Arg Gly Pro Cys Ala Arg Thr Ser Gly Glu Pro Lys Asp  
420 425 430

Val Glu Ser Asn Ser Pro Asp Ala Thr Val Val Phe Ser Asn Ile Lys  
435 440 445

Tyr Gly Pro Ile Gly Ser Thr Tyr

450

455

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 1485

&lt;212&gt; DNA

<213> *Coriolus hirsutus*

&lt;400&gt; 11

atgttcccca ccgcccct cctctcgctc tccttcgcgg cgatcgcccta cggccagcag 60  
gtcggcacgc tcaccgccga gtcgcacccc aagctcagcg tgcagcaatg caccgccggc 120  
ggcagctgcc agaccctgca gcgctccgctc gtcctcgact ccaactggcg ttggctccac 180  
tctacctcgg gctcgaccaa ctgctacacc ggcaaacacct gggacgcgctc cctctgcccc 240  
gacccacca cgtgcgcggc aaactgtgcc ctcgatggcg ctgactactc tggctcgcgt 300  
tgatctcacc tgaagaccct tgtgcatact caacaatccc tctaggcacc tacggtatca 360  
ccaccagcgg caacgagctc aacctcaggt tcgtcacgaa gggccagtac tccaccaaca 420  
tcggctcccg cgtctacctt ctctccgagg acgacagcac gtacgagatg ttcaacctca 480  
acaaccagga gttcacgttc gacgtcgaca tgtcgaacct cccgtgcggc ctcaacggcg 540  
cgctctactt cgtggagatg gacaaggacg gtggctcatc ccgcttcccc accaacaagg 600  
ccggctccaa gtacgggtacc ggctactgcg acaccagtg cccgcacgat atcaagttca 660  
tcaacggcga ggtaagatgc cgcgtctcaa cgcagtaaaa ccatgctgac tcgctcttcc 720  
gcacgccagg ccaacgtcct cggctgggag ggctccccga acgacccgaa cgcgggaacc 780  
ggccagtagc gaacgtgctg caacgagatg gacatctggg aggcgaacca gaacggcgcg 840  
gcggtcacgc cgcacgtctg ctccgtcgac ggccagacgc gctgcgaggg cacggactgc 900  
ggcgacggcg acgagcggta cgacggcatc tgcgacaagg acggctgcga cttcaactcg 960  
taccgcatgg gcgaccagtc cttcctcggc ctccggcaaga ccgtcgacac ctggaagaag 1020  
ttcacgctcg tcaccagtt cctcaccgcg gacaacacga cgaccggcca gctcacggag 1080  
atccgccggc tgtacgtgca ggacggcaag gtcacgcga actcgaagac gaacatcccc 1140  
ggcctcgact cgttcgactc catcaccgac gacttctgca acgcgcagaa ggaggtcttc 1200



ggcgacacca actcgttcga gaagctcggc ggcctcgcgg agatgggcaa ggccttccag 1260  
aagggcatgg tcctcgatcat gagcatctgg gacgaccacg ccgccaacat gctctggctc 1320  
gacagcgact accccaccga cgccgaccgc tcgaagccag gtgtcgcccg tggcccgtgc 1380  
ccgaccagct ctggcggtccc caccgatgtc gagtcgcaga gcccacgc gaacgtcatc 1440  
ttctccaaca tcaagaccgg cccattggc tcgacctacg cttga 1485

<210> 12

<211> 457

<212> PRT

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 12

Met Phe Pro Thr Ala Ala Leu Leu Ser Leu Ser Phe Ala Ala Ile Ala

1

5

10

15

Tyr Gly Gln Gln Val Gly Thr Leu Thr Ala Glu Ser His Pro Lys Leu

20

25

30

Ser Val Gln Gln Cys Thr Ala Gly Gly Ser Cys Gln Thr Leu Gln Arg

35

40

45

Ser Val Val Leu Asp Ser Asn Trp Arg Trp Leu His Ser Thr Ser Gly

50

55

60

Ser Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Ala Ser Leu Cys Pro

65

70

75

80

Asp Pro Thr Thr Cys Ala Ala Asn Cys Ala Leu Asp Gly Ala Asp Tyr

85

90

95

Ser Gly Thr Tyr Gly Ile Thr Thr Ser Gly Asn Glu Leu Asn Leu Arg  
100 105 110

Phe Val Thr Lys Gly Gln Tyr Ser Thr Asn Ile Gly Ser Arg Val Tyr  
115 120 125

Leu Leu Ser Glu Asp Asp Ser Thr Tyr Glu Met Phe Asn Leu Asn Asn  
130 135 140

Gln Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Met Ser Asn Leu Pro Cys Gly Leu  
145 150 155 160

Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Glu Met Asp Lys Asp Gly Gly Ser Ser  
165 170 175

Arg Phe Pro Thr Asn Lys Ala Gly Ser Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys  
180 185 190

Asp Thr Gln Cys Pro His Asp Ile Lys Phe Ile Asn Gly Glu Ala Asn  
195 200 205

Val Leu Gly Trp Glu Gly Ser Pro Asn Asp Pro Asn Ala Gly Thr Gly  
210 215 220

Gln Tyr Gly Thr Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Gln  
225 230 235 240

Asn Gly Ala Ala Val Thr Pro His Val Cys Ser Val Asp Gly Gln Thr  
245 250 255

Arg Cys Glu Gly Thr Asp Cys Gly Asp Gly Asp Glu Arg Tyr Asp Gly  
260 265 270

Ile Cys Asp Lys Asp Gly Cys Asp Phe Asn Ser Tyr Arg Met Gly Asp  
275 280 285

Gln Ser Phe Leu Gly Leu Gly Lys Thr Val Asp Thr Ser Lys Lys Phe  
290 295 300

Thr Val Val Thr Gln Phe Leu Thr Ala Asp Asn Thr Thr Thr Gly Gln  
305 310 315 320

Leu Thr Glu Ile Arg Arg Leu Tyr Val Gln Asp Gly Lys Val Ile Ala  
325 330 335

Asn Ser Lys Thr Asn Ile Pro Gly Leu Asp Ser Phe Asp Ser Ile Thr  
340 345 350

Asp Asp Phe Cys Asn Ala Gln Lys Glu Val Phe Gly Asp Thr Asn Ser  
355 360 365

Phe Glu Lys Leu Gly Gly Leu Ala Glu Met Gly Lys Ala Phe Gln Lys  
370 375 380

Gly Met Val Leu Val Met Ser Ile Trp Asp Asp His Ala Ala Asn Met  
385 390 395 400

Leu Trp Leu Asp Ser Asp Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Ser Lys Pro  
405 410 415

Gly Val Ala Arg Gly Pro Cys Pro Thr Ser Ser Gly Val Pro Thr Asp  
420 425 430

Val Glu Ser Gln Ser Pro Asn Ala Asn Val Ile Phe Ser Asn Ile Lys  
435 440 445

Thr Gly Pro Ile Gly Ser Thr Tyr Ala  
450 455

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13

cagtggggig actggtgcaa c

21

<210> 14

<211> 1704

<212> DNA

<213> *Coriolus hirsutus*

&lt;400&gt; 14

atgtccaagt tcgcgacgct cctcgtcttc ctgactgtcg tcccctccct ggcttacgcc 60  
caggcgctgc tgtacggaca gtgcggtggt attggcttct gtatgtctcg ttttcacgtg 120  
cttctgtgag atgcgtactc accaccgtat cctcgcagcg ggtccgacga cttgtgttgc 180  
cggcgcccgtt tgcacgaagc agaacgacta ctactcgcag tgccctgtatg tcgtgtcaac 240  
cagttatgag ataaagcaac ttgctaactt attacgacag tccgggcgcc gctgcaccga 300  
ccactgttgc accgaccacc acacctaacg cgcccacatc tgcacctggt ggtggctcgc 360  
ccacatcttc tgctccgagc gcccttcga gcactcctgc tgctggcaac cccttcgacg 420  
gttttgaggt acagtgttct cgaacaccgc aaatcttcgc atgctcacc atgtatacaa 480  
cagatctacc tgagccctta ctacgccaag gaggtcgtcg ctgccgtgc cgccatcacc 540  
gatcccacgc tgaagagcaa ggccgcaagc gttgctaaca tcccgaactt cacatggctc 600  
gactccgtgt cgaagggtgcc tgacctcggc acgtacctcg ccgacgcgtc ctcgatccag 660  
agcagcaccg gcaagaagca gctcgtgccg atcgtcgtgt acgacctgcc cgaccgcgac 720  
tgcgcggcga aggcggtccaa cggcgagttc agcatcgcgg acggcggcgc ggccaagtac 780  
aaggactaca tcgaccagat cgtcgcgcag atcaagcagt tcccgcagct gcgcgtcgtc 840  
gcggtcatcg agcccgactc gctcgcgaac ctcgtcacga acctgaacgt gcagaagtgc 900  
gcgaacgcgg aggcgacgta caaggccagc gttacgtacg cgctccagca gctctcgtcc 960  
gtcggcgtgt accagtacat ggacgcgggc cagcccggtt ggctcggctg gcccgccaac 1020  
atccagcccc cggcgaccct tttcgcggag atgttcaaga gcgcgaactc gtcgcctttc 1080  
gtccgcggtc tcgccactag tgagcactca cctagacaca gcgatgtgga tggccactaa 1140  
cggagcgtcg cagacgtcgc caactacaac gccctgaccg ccgcctcccc cgaccgatc 1200  
accagaaca accccaacta cgacgagtcc cactacatta acgtgagtcc ctctgtctca 1260  
gcgctgttca gccacaatgc tcacattgca cgcacgcacc caggcgctcg gccgatgct 1320  
caagtccgcc ggcttccccg cgcagttcgt cgtcgaccag ggccgcgcgc gccagcagaa 1380  
cctccgccag cagtggggcg actggtgcaa catcaagggc gccggcttcg gcacgcgccc 1440  
gacgacgaac accggcaacc cgctcatcga cgcgatcatc tgggtgaagc ccggaggcga 1500  
gtccgacggc acctcgaaca gctcgtcgcc ccgctacgac agcacgtgct ctctgggtacg 1560

tcttctctgt cctcctgcat ctgggggggtg cgtgtgctta ccactgcggt gcagtccgac 1620  
gcgacgggtcc ccgcacccga ggccggtacc tggttccagg cgtacttcga gaccctcgtg 1680  
tccaaggcca acccgccgct gtga 1704

<210> 15

<211> 453

<212> PRT

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 15

Met Ser Lys Phe Ala Thr Leu Leu Ala Leu Leu Thr Val Val Pro Ser  
1 5 10 15

Leu Ala Tyr Ala Gln Ala Ser Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly  
20 25 30

Phe Ser Gly Pro Thr Thr Cys Val Ala Gly Ala Val Cys Thr Lys Gln  
35 40 45

Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Gly Ala Ala Ala Pro Thr Thr  
50 55 60

Val Ala Pro Thr Thr Thr Pro Asn Ala Pro Thr Ser Ala Pro Gly Gly  
65 70 75 80

Gly Ser Pro Thr Ser Ser Ala Pro Ser Ala Pro Ser Ser Thr Pro Ala  
85 90 95

Ala Gly Asn Pro Phe Asp Gly Phe Glu Ile Tyr Leu Ser Pro Tyr Tyr  
100 105 110

Ala Lys Glu Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ile Thr Asp Pro Thr Leu  
115 120 125

Lys Ser Lys Ala Ala Ser Val Ala Asn Ile Pro Thr Phe Thr Trp Leu  
130 135 140

Asp Ser Val Ser Lys Val Pro Asp Leu Gly Thr Tyr Leu Ala Asp Ala  
145 150 155 160

Ser Ser Ile Gln Ser Ser Thr Gly Lys Lys Gln Leu Val Pro Ile Val  
165 170 175

Val Tyr Asp Leu Pro Asp Arg Asp Cys Ala Ala Lys Ala Ser Asn Gly  
180 185 190

Glu Phe Ser Ile Ala Asp Gly Gly Ala Ala Lys Tyr Lys Asp Tyr Ile  
195 200 205

Asp Gln Ile Val Ala Gln Ile Lys Gln Phe Pro Asp Val Arg Val Val  
210 215 220

Ala Val Ile Glu Pro Asp Ser Leu Ala Asn Leu Val Thr Asn Leu Asn  
225 230 235 240

Val Gln Lys Cys Ala Asn Ala Glu Ala Thr Tyr Lys Ala Ser Val Thr  
245 250 255

Tyr Ala Leu Gln Gln Leu Ser Ser Val Gly Val Tyr Gln Tyr Met Asp  
260 265 270

Ala Gly His Ala Gly Trp Leu Gly Trp Pro Ala Asn Ile Gln Pro Ala  
275 280 285

Ala Thr Leu Phe Ala Glu Met Phe Lys Ser Ala Asn Ser Ser Pro Phe  
290 295 300

Val Arg Gly Leu Ala Thr Asn Val Ala Asn Tyr Asn Ala Leu Thr Ala  
305 310 315 320

Ala Ser Pro Asp Pro Ile Thr Gln Asn Asn Pro Asn Tyr Asp Glu Ser  
325 330 335

His Tyr Ile Asn Ala Leu Gly Pro Met Leu Lys Ser Ala Gly Phe Pro  
340 345 350

Ala Gln Phe Val Val Asp Gln Gly Arg Ala Gly Gln Gln Asn Leu Arg  
355 360 365

Gln Gln Trp Gly Asp Trp Cys Asn Ile Lys Gly Ala Gly Phe Gly Thr  
370 375 380

Arg Pro Thr Thr Asn Thr Gly Asn Pro Leu Ile Asp Ala Ile Ile Trp  
385 390 395 400

Val Lys Pro Gly Gly Glu Ser Asp Gly Thr Ser Asn Ser Ser Ser Pro



405

410

415

Arg Tyr Asp Ser Thr Cys Ser Leu Ser Asp Ala Thr Val Pro Ala Pro

420

425

430

Glu Ala Gly Thr Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Glu Thr Leu Val Ser Lys

435

440

445

Ala Asn Pro Pro Leu

450

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 16

gtaaaacgac ggccagt

17

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 17

ggaaacagct atgaccatg

19

<210> 18

<211> 1327

<212> cDNA

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 18

aagcactcta ttgacaccgt catgtttctcg tctaccctct ccttcgccgc cctcgcgctc 60  
gcgctcgtcg cgcccactgc cgtcaacgct cacggtttca ttcataaata tgagatcggc 120  
ggcaagagct actccggttg gctcccgttc tcggacccct acgagagccc tgtcccgagc 180  
cgcacgcgag gcaagatccc gagtgacggc cctatccttg atgtcacttc tcctgacctt 240  
gcctgcaaca agggggggcga gtctggcgtc aaggccatcg ccaactgcggc agcaggcagc 300  
cagatcacct ttgactggaa cagttggccc gcagatcaca tgggcccggg gaccacatac 360  
atggcgtctt gcaacgggtga ttgcgcgtct ttgatgcct ccaacgcgaa gtggttcaag 420  
attgacgtg ccggctactc gaacggcaag tgggctgcca ccaagctcat tgagaacggc 480  
gccaagtgga ccagcaccat tcccagcgag ctcaaggctg gtgaatactt ggtccgtcat 540  
gagatcattg ctctccacga cgccgggtgc cctcagttct accccagctg cgctcaggtg 600  
aaggtcactg gtggtggtag ccaggttccc tctggttctt ccctcgtgtc cattccgggg 660  
ctctacacca ttcaggagtt cccgacatct ggtccgacag cttcaagagc tttgccattc 720  
ctggacccgc ggtcgccttc agtggctcca acagcggctc tggcgattct cagcctgctg 780  
cctcctctc taccacgcgc gctacttctt cggcggcctc ccagtctgcg tcctcgacgc 840  
aggttcacac ctccgcggag acctccgcgc aggccctcggc gacgtctgtt gcgtcccacg 900

catctttccgc tgcccacact tcctcggccg catccgcgtc gaagccctcg tcgacgggga 960  
ccggaaggtg ctctctaag cgcactcgcc gcggcatggt caagcgcaac gtctctcacc 1020  
acgccaagcg ccaccacat tgatttctct ttcttccttg cgctcttggc tgtctcgaga 1080  
tctcgatatg cttcagagaa gcactggtcg acgggatctc aatcgatggt gatacagatg 1140  
ggttgactcc cctccgcgct ctgctccac cgcgccgggg atagagtcct cgcgcgcggc 1200  
ttccttaacg ttattcattc ctgctccgc ataagtctcc gcatgctatg tatcggtgct 1260  
gctagcccg cgcactgccc gacgattgta ccggaataca acgcgctttg tcctttgtga 1320  
aaaaaaa 1327

<210> 19

<211> 374

<212> PRT

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 19

Met Phe Ser Ser Thr Leu Ser Phe Ala Ala Leu Ala Leu Ala Leu Val

1 5 10 15

Ala Pro Thr Ala Val Asn Ala His Gly Phe Ile His Glu Tyr Glu Ile

20 25 30

Gly Gly Lys Ser Tyr Ser Gly Trp Leu Pro Phe Ser Asp Pro Tyr Glu

35 40 45

Ser Pro Val Pro Ser Arg Ile Glu Arg Lys Ile Pro Ser Asp Gly Pro

50 55 60

Ile Leu Asp Val Thr Ser Pro Asp Leu Ala Cys Asn Lys Gly Gly Glu

65

70

75

80

Ser Gly Val Lys Ala Ile Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ser Gln Ile Thr

85

90

95

Phe Asp Trp Asn Ser Trp Pro Ala Asp His Met Gly Pro Val Thr Thr

100

105

110

Tyr Met Ala Ser Cys Asn Gly Asp Cys Ala Ser Phe Asp Ala Ser Asn

115

120

125

Ala Lys Trp Phe Lys Ile Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Asn Gly Lys Trp

130

135

140

Ala Ala Thr Lys Leu Ile Glu Asn Gly Ala Lys Trp Thr Ser Thr Ile

145

150

155

160

Pro Ser Glu Leu Lys Ala Gly Glu Tyr Leu Val Arg His Glu Ile Ile

165

170

175

Ala Leu His Asp Ala Gly Ala Pro Gln Phe Tyr Pro Ser Cys Ala Gln

180

185

190

Val Lys Val Thr Gly Gly Gly Ser Gln Val Pro Ser Gly Ser Ser Leu

195

200

205

Val Ser Ile Pro Gly Leu Tyr Thr Ile Gln Glu Phe Pro Thr Ser Gly

210

215

220

Pro Thr Ala Ser Arg Ala Leu Pro Phe Leu Asp Pro Arg Ser Pro Ser  
225 230 235 240

Val Ala Pro Thr Ala Ala Leu Ala Ile Leu Ser Leu Leu Pro Pro Pro  
245 250 255

Leu Pro Thr Pro Leu Leu Leu Arg Arg Pro Pro Ser Leu Arg Pro Arg  
260 265 270

Arg Arg Phe Thr Pro Pro Arg Arg Pro Pro Arg Arg Pro Arg Arg Arg  
275 280 285

Leu Leu Arg Pro Thr His Leu Pro Leu Pro Thr Leu Pro Arg Pro His  
290 295 300

Pro Arg Arg Ser Pro Arg Arg Arg Gly Pro Glu Gly Ala Pro Leu Ser  
305 310 315 320

Ala Leu Ala Ala Ala Trp Ser Ser Ala Thr Ser Leu Thr Thr Pro Ser  
325 330 335

Ala Thr Thr Ile Asp Phe Ser Phe Phe Leu Ala Leu Leu Ala Val Ser  
340 345 350

Arg Ser Arg Tyr Ala Ser Glu Lys His Trp Ser Thr Gly Ser Gln Ser  
355 360 365

Met Leu Ile Gln Met Gly  
370 374

<210> 20

<211> 735

<212> DNA

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 20

```
gcggggcccggt actcgctcct gctcgaccag tggggcaagg acggcgcgac gtccggctcc 60
caatgcgcga acctcatcag cctgagcggc agtaccgtcg cgtggaagac gacctggcag 120
tggacggggcg gctccggcgt gaagagcttc acgaacatcc agtcaacga gggcctcaac 180
aagcagctca gcgcgatcaa gagcatcccc acgacgtggc agtggtcgca gagcgcgctcc 240
gggtcgatcg tcgcggacgt cgcgtaacgac ctcttcacgg cgaacaccgc cgggggctcg 300
aacgtgaacg agatcatgat ctggctcgcg aacttcaacg cgggcccgat ctcgatccag 360
tacggcgcgg acggcaagcc cgtgcccgtc gcgtcgaacc tgagcctcgc gggccacacc 420
tggaacctgt acagcggctc gaacggcgcg aacgcggtgt tctcgttcct gccacgagc 480
ggcacgatta cgagcttcag cggggacgtg aacgtgttcc tccagtactt gacgcagcac 540
cagggcgtca gcacctcgca gttcctcgtc accgcgcaag cgggtacgga gcctacatct 600
ggctctgcga cgtcacgac gtctgcatac agcttggcta tcaactaggg agacgaaaca 660
tgtacattca gaacttgtgc cgacaggaat cacattactt cagacttccc gaaaaaaaaa 720
aaaaaaaaaa aaaaaa 735
```

<210> 21

<211> 216

<212> PRT

<213> *Coriolus hirsutus*

<400> 21

Ala Gly Pro Tyr Ser Leu Leu Leu Asp Gln Trp Gly Lys Asp Gly Ala  
1 5 10 15  
Thr Ser Gly Ser Gln Cys Ala Asn Leu Ile Ser Leu Ser Gly Ser Thr  
20 25 30  
Val Ala Trp Lys Thr Thr Trp Gln Trp Thr Gly Gly Ser Gly Val Lys  
35 40 45  
Ser Phe Thr Asn Ile Gln Leu Asn Glu Gly Leu Asn Lys Gln Leu Ser  
50 55 60  
Ala Ile Lys Ser Ile Pro Thr Thr Trp Gln Trp Ser Gln Ser Ala Ser  
65 70 75 80  
Gly Ser Ile Val Ala Asp Val Ala Tyr Asp Leu Phe Thr Ala Asn Thr  
85 90 95  
Ala Gly Gly Ser Asn Val Asn Glu Ile Met Ile Trp Leu Ala Asn Phe  
100 105 110  
Asn Ala Gly Pro Ile Ser Phe Gln Tyr Gly Ala Asp Gly Lys Pro Val  
115 120 125  
Pro Val Ala Ser Asn Leu Ser Leu Ala Gly His Thr Trp Asn Leu Tyr  
130 135 140  
Ser Gly Ser Asn Gly Ala Asn Ala Val Phe Ser Phe Leu Pro Thr Ser  
145 150 155 160  
Gly Thr Ile Thr Ser Phe Ser Gly Asp Val Asn Val Phe Leu Gln Tyr  
165 170 175  
Leu Thr Gln His Gln Gly Val Ser Thr Ser Gln Phe Leu Val Thr Ala  
180 185 190  
Gln Ala Gly Thr Glu Pro Thr Ser Gly Ser Ala Thr Leu Thr Thr Ser  
195 200 205  
Ala Tyr Ser Leu Ala Ile Asn Xaa  
210 215

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 22

atgaagttac ttcttgctct c

21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 23

tcacaggaag ggttcgagt c

21

<210> 24

<211> 1889

<212> DNA

<213> Phanerochaete chrysosporium



&lt;400&gt; 24

atgaagtact tcttgctctc agtagcagcg acgcttgccc ttagtgcacc tgcgcttggt 60  
gtcgtgtgtt ggggccaatg cggtgtaagc atatgtgttc atatgagagg cgtacgagaa 120  
ggttgaccgc gcaacaggga atcggcttta gtgggagtag tacttgcat gctggcaatc 180  
actgcgttta tctgaacgat tgtgaggta atgtcatttc aatgccatga tttgctgacc 240  
gatatccttg cagattattc gcaatgccag cccggcgcgg cgacgaccac ggtccggtcg 300  
acaagtacca ttgcttcaac gacatctacc gcaccatcaa gcagcaatag cctttgctcc 360  
ggcagccgca cgaagttcaa gtttttcggt gtcaatgagt ctggtgctga gttcggtaat 420  
ctcaacatcc caggtgtcct aggcacggac tacacctggc cttcgccgtc cagcatcgac 480  
gtaagtgata catcatatca gagctgctaa gcaggttgct gatagtgatg cactagtctt 540  
tcatgggcaa gggattcaac acctccgca ttccgttcct catggagcgt atgagccctc 600  
ccgcgacggg cctcaccggt ccgtttgatc agacctatct gagcgggtctt cagacggtag 660  
gccaaacgta atagctggac cttgcgggga gtaaggctga ccatcacctt acggcagatt 720  
gtcagctata tcaccggaag ggggggctat gcgctcgtag accgtgagtg acggctcgca 780  
cgcaagtagt aggaggtcat ctgatagtga aggactgcag cgcacaactt tatgatctac 840  
aatggcaca ccatagcga cacaacgcg tgagcactcc tttagtttcg tctctgcgtt 900  
agctccgttc tgatgataca acaacacagc ttccagactt gtacgtgtgc tctgcctgaa 960  
cccgttggtc cgttgatcat catagtgatg cgttctcaca ggggtggcaca acctcgccac 1020  
cgtcttcgta cgtctgtttc catgcgtgaa gcctgcaagg gtcgcccctg atcggtttta 1080  
tagaaatcca accccaatgt cgtcttttgt gaatgagttc ggcgtgtgtg ctactcttag 1140  
caacgagctt acagcttggt agatgtcatg aacgagccgc acgacattcc cgcacagacg 1200  
gtcttcaacc tgggtgagtt cggccgagtt tggggacttc tgtcaaactc attcggcggt 1260  
gtttccccct agaaccaagc cgctatcaac ggaatccgtg ctgcgggtgc cacctcgcaa 1320  
cttatccttg ttgagggcac tagctacact ggcgcttgga gtgagatcag acccttcaca 1380  
cccgcagaac ctgcccattg attgattgtt tcgcagcgtg gacgacttct tccggtaatg 1440  
gtgctgtctt tgggtgctat caagatccca acaacaatgt tgccatcggg gtagtcggga 1500  
agcgtaccgg tctgccaagt gctcacgggt aagcgtggga aagagatgca ccagtacctc 1560  
gacagcgacg gctccggcac gtccccaca tgcgtttcgt ccacgatcgg tgcggagcgt 1620

ctccaagcgg cgacacagtg gctgcagcag aacaacctga aaggcttcct gggtagagatc 1680  
 ggagctgggtt cgaacgggtgc gtcggatcat gtcctgtgtt gcagcctgtg ctgaccgtag 1740  
 tcgttcaaac cagccgactg catcagtgcc gttcaggggtg cgctgtgcga gatgcaacag 1800  
 tccggtgtct ggctcggcgc tctctgggtg gccgcaggcc catggtgggg caccgtacgt 1860  
 gactgacctc ttgctgcgtg tgcacgtgca gactgctcat tgctgccaca gtattttcaa 1920  
 tcgatcgagc ccccgagtgg cgccgcgata cctccatcc tcccgcaggc actcgaaccc 1980  
 ttcctgtga 1989

<210> 25

<211> 386

<212> PRT

<213> *Phanerochaete chrysosporium*

<400> 25

Met Leu Lys Tyr Ala Ser Ile Ala Leu Ala Leu Ala Thr Leu Gly Val

1 5 10 15

Ala Gln Gln Gln Gln Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly

20 25 30

Ala Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Val Cys Ser Val Leu Asn Pro Tyr

35 40 45

Tyr Ser Gln Cys Ile Pro Gly Ala Ala Thr Val Thr Ser Ser Ser Ala

50 55 60

Pro Ser Thr Pro Thr Pro Pro Ala Gly Ala Leu Pro Arg Leu Gly Gly

65 70 75 80

Val Asn Thr Ala Gly Tyr Asp Phe Ser Val Ala Thr Asp Gly Ser Phe  
85 90 95

Thr Gly Thr Gly Val Ser Pro Pro Val Ser Gln Phe Ser His Phe Ser  
100 105 110

Ser Gln Gly Ala Asn Leu Tyr Arg Ile Leu Phe Ala Trp Gln Leu Met  
115 120 125

Thr Pro Thr Leu Gly Gly Thr Ile Ser Gln Ser Phe Leu Ser Arg Tyr  
130 135 140

Asp Gln Thr Val Gln Ala Ala Leu Asn Ser Gly Pro Asn Val Phe Val  
145 150 155 160

Ile Ile Asp Leu His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Ala  
165 170 175

Gln Gly Gly Pro Thr Asp Ala Gln Phe Gln Ser Ile Trp Thr Gln Leu  
180 185 190

Ala Gln Lys Tyr Gly Ser Asn Gln Arg Val Ile Phe Gly Ile Met Asn  
195 200 205

Glu Pro His Asp Ile Pro Ser Ile Ser Thr Trp Val Asn Ser Val Gln  
210 215 220

Gly Ala Val Asn Ala Ile Arg Ala Ala Gly Ala Thr Asn Tyr Leu Leu

225                      230                      235                      240

Leu Pro Gly Ser Ser Trp Ser Ser Ala Gln Ala Phe Pro Thr Glu Ala  
                         245                      250                      255

Gly Pro Leu Leu Val Lys Val Thr Asp Pro Leu Gly Gly Thr Ser Lys  
                         260                      265                      270

Leu Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr  
                         275                      280                      285

His Pro Asp Cys Thr Thr Asp Asn Val Gln Val Leu Gln Thr Leu Val  
                         290                      295                      300

Gln Phe Leu Gln Ala Asn Gly Asn Arg Gln Ala Ile Leu Ser Glu Thr  
305                      310                      315                      320

Gly Gly Gly Asn Thr Ser Ser Cys Glu Ser Leu Leu Ala Asn Glu Leu  
                         325                      330                      335

Ala Tyr Val Lys Ser Ala Tyr Pro Thr Leu Ala Gly Phe Ser Val Trp  
                         340                      345                      350

Ala Ala Gly Ala Phe Asp Thr Thr Tyr Val Leu Thr Val Thr Pro Asn  
                         355                      360                      365

Ala Asp Gly Ser Asp Gln Pro Leu Trp Val Asp Ala Val Lys Pro Asn  
                         370                      375                      380

Leu Pro

385

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 26

atgatacctc tccgctctgc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 27

tatcttcctg atgcgattcc

20

<210> 28

<211> 2138

<212> DNA

<213> Phanerochaete chrysosporium

<400> 28

```
atgatacctc tccgctctgc agtcgcgtcc tcactacttc tcgccagtct cggggctgcc 60
cagctcccg c tgccgaaccc tccgtgggtg ccgccgaacg caacgttcgg gacgcaccct 120
agcaatcctt ctgacgggtc cgggaacccg cactggacga atatcctcgg gagcacgctc 180
tacttctatg aagaacagcg gagcggaaag ctgcccgtta cgaaccgcgt cccgtggcga 240
aacgatagtg cgacggacga cggcagggac gtcggactgg acctgagtgg cggctactat 300
gatgctggag gttcgtatth gagtacgctc tcccgagagg tcgtctaacc ttccggtgta 360
gactacatca agtatacctt tcctatgggtg cgtaacacgc agcgtactgg ttctgaaagc 420
taatgtcaat ggcgacccag tccttctctg ttatgtctat atgctggggc gcgctggatt 480
atggcaaggg taaggcaaga atttctcgtt cgctgccctc cattgaaacc cgtctgcgtt 540
aggttatgac ctcgcaaacc aaaccgcgta tctcgacgac atgctccggt ggagcctaga 600
ctggctaatt aaggtatggt caaggatata cttgcatcga cttacctact tgtctgacga 660
tgcatgtcaa ggcccatcct gacccaaaca cgctgtatgt acaaatcggg gatgcagatc 720
tggaacaacgc atattgggga ggcgacagag gcatacctac accaagaact tcatatgcaa 780
tcaacagtac caggtgcgcg ctttgtcgcg ttatcctcta ggcaatacta agattttgct 840
tagccccggt acagacgccg ccgcacaagc cgccgcggct ttcgctgcct gttctgcatt 900
atacaacaat cgaacattgt cgcagcccg c acctaacggt ataacaaata catcttacgc 960
atcgacgctc cttcagcatg cgcaacaact gtatcattht gccacaaact cttctataacc 1020
tcaagttacc taccagacgt ccgtgccgtc ggtcgccgac gcatacgcac cctccggatt 1080
ccaagacgag ctagccatcg cggctctggt tatctcgctt gcaggaaatt ctagcgacgc 1140
ttactcgcaa gcgtctcagc tttaccgcaa gcaagggctt tctaagcact tggaagatga 1200
cgctgtgttc aactgggatg agaagtcacc cggcgtcgcc cttcttgccg cgcagattgc 1260
gcagaagtat cctcagctcg cgaacggcac tgggtgtggat tggaagagcg acctgaacaa 1320
ctacttcgat cgcacgtcga acaacagtgg cagatcattc ctaacatcag gtaagcgtgt 1380
caatctctta tcccagttct tcgtgctgac agttcgctct aggcgggtctg ctttattatc 1440
```

caggcgattc agacgacgct acccttaacc cggcattgaa cgctgccatg ctctctttgc 1500  
 gctatgccga ctcgggcttt gcatccagca gtgagaagca gtctgtttac cgccagttcg 1560  
 cccagtctca aatcgactat ttcttgggca ataaccaat gactgggtggg tagtgttttc 1620  
 ttgacattat gtctatccgc gtcttactcg ttgcagtacc gtatatggtt ggcggtgcacc 1680  
 cgaacgcgcc atcaaaccct cattctgcct tggctacggg tgcttcaccc caggacatcg 1740  
 cgaacatcga cacggtccca gagcacgagg cttacgtcct ttatggcgga gtagttggag 1800  
 ggccgaatga tgacgacctc ttttgggacc tacggagcga ttgggtggag aacgaggttg 1860  
 ggctggacta cgttgccccg gtcgtgacca tcgcggcgcg ggaactcgtc agtggagcag 1920  
 gcgacccttg gtacacacag ctgcaggttg ggtcgtacga ggagcggaga ccgggtggcc 1980  
 agccttgtga tgctgcaatc tctgcgggat gtcgcggcca tgattggaga gtgggcaaga 2040  
 tcgtcatggg tgtcttggtc ggagtgactg gtctcgtggt attgtctctt ggtaccgtgt 2100  
 ggatggtggt ggcatatagg aatcgcatca ggaagata 2138

<210> 29

<211> 592

<212> PRT

<213> Phanerochaete chrysosporium

<400> 29

Met Ile Pro Leu Arg Ser Ala Val Ala Ser Ser Leu Leu Leu Ala Ser

1

5

10

15

Leu Gly Ala Ala Gln Leu Pro Leu Pro Asn Pro Pro Trp Val Pro Leu

20

25

30

Asn Ala Thr Phe Gly Thr His Pro Ser Asn Pro Ser Asp Gly Ser Gly

35

40

45

Asn Pro His Trp Thr Asn Phe Leu Glu Asn Thr Leu Tyr Phe Tyr Glu  
50 55 60

Glu Gln Arg Ser Gly Lys Leu Pro Val Thr Asn Arg Val Pro Trp Arg  
65 70 75 80

Asn Asp Ser Ala Thr Asp Asp Gly Arg Asp Val Gly Leu Asp Leu Ser  
85 90 95

Gly Gly Tyr Tyr Asp Ala Gly Asp Tyr Ile Lys Tyr Thr Phe Pro Met  
100 105 110

Ser Phe Ser Val Met Ser Ile Cys Trp Gly Ala Leu Asp Tyr Gly Lys  
115 120 125

Gly Tyr Asp Leu Ala Asn Gln Thr Ala Tyr Leu Asp Asp Met Leu Arg  
130 135 140

Trp Ser Leu Asp Trp Leu Met Lys Ala His Pro Asp Pro Asn Thr Leu  
145 150 155 160

Tyr Val Gln Val Gly Asp Ala Asp Leu Asp Asn Ala Tyr Trp Gly Gly  
165 170 175

Asp Arg Gly Ile Pro Thr Pro Arg Thr Ser Tyr Ala Ile Asn Ser Thr  
180 185 190

Ser Pro Gly Thr Asp Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala Ala Phe Ala Ala



195 200 205

Cys Ser Ala Leu Tyr Asn Asn Arg Thr Leu Ser Gln Pro Ala Pro Asn  
210 215 220

Gly Ile Thr Ser Thr Ser Tyr Ala Ser Thr Leu Leu Gln His Ala Gln  
225 230 235 240

Gln Leu Tyr Asn Phe Ala Thr Asn Ser Ser Val Pro Gln Val Thr Tyr  
245 250 255

Gln Ala Ser Glu Pro Ser Val Ala Asp Ala Tyr Ala Ser Ser Gly Phe  
260 265 270

Gln Asp Glu Leu Ala Ile Ala Ala Leu Phe Ile Ser Leu Ala Gly Asn  
275 280 285

Ser Ser Asp Ala Tyr Pro Gln Ala Ser Gln Val Tyr Arg Lys Gln Gly  
290 295 300

Leu Ser Lys His Leu Glu Asp Asp Ala Val Phe Asn Trp Asp Glu Lys  
305 310 315 320

Ser Pro Gly Val Ala Leu Leu Ala Ala Gln Ile Ala Gln Lys Tyr Pro  
325 330 335

Glu Leu Ala Asn Gly Thr Gly Val Asp Trp Lys Ser Asp Leu Asn Asn  
340 345 350

Tyr Phe Asp Arg Ile Val Ser Asn Ser Gly Arg Ser Phe Leu Thr Ser  
355 360 365

Gly Gly Leu Leu Tyr Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Asp Ala Thr Leu Asn  
370 375 380

Pro Ala Leu Asn Ala Ala Met Leu Leu Leu Arg Tyr Ala Asp Ser Gly  
385 390 395 400

Leu Ala Ser Ser Ser Glu Lys Gln Ser Ala Tyr Arg Gln Phe Ala Gln  
405 410 415

Ser Gln Ile Asp Tyr Phe Leu Gly Asn Asn Pro Met Thr Val Gln Tyr  
420 425 430

Met Val Gly Val His Pro Asn Ala Pro Ser Asn Pro His Ser Ala Leu  
435 440 445

Ala Thr Gly Ala Thr Pro Gln Asp Ile Ala Asn Ile Asp Thr Val Pro  
450 455 460

Glu His Glu Ala Tyr Val Leu Tyr Gly Gly Val Val Gly Gly Pro Asn  
465 470 475 480

Asp Asp Asp Leu Phe Trp Asp Leu Arg Ser Asp Trp Val Glu Ser Glu  
485 490 495

Val Gly Leu Asp Tyr Val Ala Pro Val Val Thr Ile Ala Ala Arg Glu  
500 505 510

Leu Val Ser Gly Ala Gly Asp Pro Trp Tyr Thr Gln Leu Gln Ala Gly  
515 520 525

Ser Tyr Glu Glu Arg Arg Pro Gly Gly Gln Pro Cys Asp Ala Ala Ile  
530 535 540

Ser Ala Gly Cys Arg Gly His Asp Trp Arg Val Gly Lys Ile Val Met  
545 550 555 560

Gly Ala Leu Val Gly Val Thr Gly Leu Val Val Leu Ser Leu Gly Thr  
565 570 575

Val Trp Met Val Leu Ala Tyr Arg Asn Arg Ile Arg Lys Ile  
580 585 590

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 30

catggtgtgt ggtggatg

18

<210> 31

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 31

aagttcaaga gtctcctgt

19

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 32

ggtacagtac ttatctgtat

20

<210> 33

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 33

tctagattta ctggtacccc aacaacaatg

30

<210> 34

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 34

ccatgggttg atcgacgggt tgtcagacac g

31

<210> 35

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 35

tctagagtca cctccgt

17

<210> 36

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 36

aagcttggtggt actgtg

16

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 37

tctagagcca acctcgaggg gtgg

24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 38

ccatgggaac gtcgagccga tggg

24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 39

tctagagcca acgtcctcgg ctgg

24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 40

ccatgggtag gtcgagccga tggg

24

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 41

tctagagcca acgtcctcgg ctgg

24

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 42

ccatggagcg taggtcgagc caatg

25

<210> 43



<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 43

tctagaatct acctgagccc ttac

24

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 44

ccatggctca ctagtggcga gacc

24

<210> 45

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 45

tctagagctc acggtttcat tcatg

25

<210> 46

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 46

ccatgggggtg tagagccccg gaatg

25

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 47

tctagagcgg gcccgctactc gctc

24

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 48

ccatgggtaa tgtgattcct gtcg

24

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 49

tctagaatga agtacttctt gctc

24

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 50

ccatggcggtt tggcgtaccg tctg

24

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 51

tctagacccc ggtacagacg ccgc

24

<210> 52

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 52

ccatgggatg ttaggaatga tctg

24

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02058

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N9/42, C12P1/02, D21C3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N9/42, C12P1/02, D21C3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI (DIALOG),  
BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X<br>A    | EP 1029922 A2 (OJI Paper Co.),<br>23 August, 2000 (23.08.00),<br>& US 6387688 B1 & JP 2000-342275 A   | 12-14<br>1-11         |
| A         | JP 11-127863 A (Mori Sangyo Kabushiki Kaisha),<br>18 May, 1999 (18.05.99),<br>(Family: none)  | 1-14                  |
| A         | Dumonceaux, T.J. et al., Cloning and sequencing<br>of a gene encoding cellobiose dehydrogenase<br>from Trametes versicolor., Gene, Vol.210, No.2,<br>pages 211 to 219, (1998) | 1-14                  |
| A         | Moukha, S.M. et al., Cloning and analysis of<br>Pycnoporus cinnabarinus cellobiose dehydrogenase.,<br>Gene, Vol.234, No.1, pages 23 to 33, (1999)                             | 1-14                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

|   |  |
|---|--|
| * Special categories of cited documents:  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date  | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family  |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  |  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |

Date of the actual completion of the international search  
30 April, 2003 (30.04.03)

Date of mailing of the international search report  
27 May, 2003 (27.05.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/02058

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | Sims, P. et al., The identification, molecular cloning and characterisation of a gene from <i>Phanerochaete chrysosporium</i> that shows strong homology to the exo-cellobiohydrolase I gene from <i>Trichoderma reesei</i> ., <i>Gene</i> , Vol.74, No.2, pages 411 to 422, (1988) | 1-14                  |
| A         | Yague, E. et al., Correlation of exons with functional domains and folding regions in a cellulase from <i>Agaricus bisporus</i> ., <i>Curr.Genet.</i> , Vol.30, No.1, pages 56 to 61, (1996)  | 1-14                  |
| A         | JP 2000-106887 A (YASOKAWA, D.),<br>18 April, 2000 (18.04.00),<br>(Family: none)  | 1-14                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09、C12N9/42、C12P1/02、D21C3/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09、C12N9/42、C12P1/02、D21C3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/Geneseq、GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq、  
WPI(DIALOG)、BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X<br>A          | EP 1029922 A2 (OJI Paper Co.) 2000.08.23<br>& US 6387688 B1 & JP 2000-342275 A  | 12-14<br>1-11    |
| A               | JP 11-127863 A (Mori Sangyo KK) 1999.05.18 (ファミリーなし)  | 1-14             |
| A               | Dumonceaux, T. J. et al.,<br>Cloning and sequencing of a gene encoding cellobiose<br>dehydrogenase from Trametes versicolor.<br>Gene, Vol. 210, No. 2, pp. 211-219 (1998) | 1-14             |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.04.03

国際調査報告の発送日

27.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J.P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4B

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |   |                  |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | Moukha, S. M. et al.,<br>Cloning and analysis of <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> cellobiose<br>dehydrogenase.<br>Gene, Vol. 234, No. 1, pp. 23-33 (1999)   | 1-14             |
| A                     | Sims, P. et al.,<br>The identification, molecular cloning and characterisation<br>of a gene from <i>Phanerochaete chrysosporium</i> that shows strong<br>homology to the exo-cellobiohydrolase I gene from<br><i>Trichoderma reesei</i> .<br>Gene, Vol. 74, No. 2, pp. 411-422 (1988) | 1-14             |
| A                     | Yague, E. et al.,<br>Correlation of exons with functional domains and folding<br>regions in a cellulase from <i>Agaricus bisporus</i> .<br>Curr. Genet. Vol. 30, No. 1, pp. 56-61 (1996)  | 1-14             |
| A                     | JP 2000-106887 A (Yasokawa, D.) 2000. 04. 18 (ファミリーなし)  | 1-14             |